

**Zur Identifizierung von Antibiotika
in der Milch mittels
Hochspannungs-Gel-Elektrophorese**

Christian-Wilhelm Baath

1979

Aus dem Tiergesundheitsdienst Bayern
Fachabteilung Produktionshygiene
Leitung: Prof. Dr. W. Gedek

vorgelegt über das Institut für Hygiene
und Technologie der Lebensmittel tierischen
Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)

Zur Identifizierung von Antibiotika
in der Milch mittels
Hochspannungs-Gel-Elektrophorese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Christian-Wilhelm Baath
aus
Neuhammer am Queiss

München 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität.
München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent: Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent: Prof. Dr. E. Scharrer

Tag der Promotion: 23. Februar 1979



Druck: Dissertationsdruck Novotny jr., Starnberg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1 Zur Identifizierung von Antibiotika in der Milch	2
2.2 Allgemeines über die Elektrophorese	6
2.3 Elektrophoretische Differenzierung von Antibiotika	12
2.3.1 Hochspannungs-Papier-Elektrophorese	12
2.3.2 Hochspannungs-Gel-Elektrophorese	13
2.3.3 Niederspannungs-Gel-Elektrophorese	17
3. Eigene Untersuchungen	20
3.1 Material	20
3.1.1 Hochspannungs-Elektrophorese-Apparatur	20
3.1.2 Zubehör	21
3.1.3 Laufmedien	22
3.1.4 Antibiotika-Reinsubstanzen	24
3.1.5 Testkeime und Antibiotikanachweismedien	24
3.1.6 Verschiedene Geräte	25
3.2 Methodik	26
3.2.1 Physikalisch-chemische Trennung	26
3.2.1.1 Präparation der Laufmedien	26
3.2.1.2 Beschichtung der Elektrophoreseplatten	26
3.2.1.3 Präparation der Antibiotika-Reinsubstanzen	27
3.2.1.4 Probenauftragung	29
3.2.1.5 Trennungsvorgang	30

3.2.2	Bioautographie	32
3.2.2.1	Testkeimsuspensionen	32
3.2.2.2	Antibiotikanachweismedien	33
3.2.2.3	Nachweis von Antibiotika	34
3.2.2.4	Auswertung	35
3.3	Versuche und Ergebnisse	36
3.3.1	Versuche mit der Methode von SCHMIDHOFER und EGLI (1974)	36
3.3.1.1	Grundversuche	36
3.3.1.2	Verteilungsmuster einiger Antibiotika bei saurer Auftrennung mit dem Laufmedium Agarose	38
3.3.1.3	Gelartefakte bei Platten mit Bahneinteilung	39
3.3.2	Trennplatten ohne Bahneinteilung	41
3.3.2.1	Verteilungsmuster einiger Antibiotika in Abhängigkeit von Laufmedium und pH-Wert	42
3.3.2.2	Beeinflussung der Wanderungsstrecken	43
3.3.2.3	Farbindikatoren	46
3.3.2.4	Stromstärke	47
3.3.2.5	Artefakte	48
3.3.2.6	Verhalten von Standard-Einzelproben zu -Mischproben	48
3.3.2.7	f-Werte	49
3.3.3	Standardmethodik	51
4.	Besprechung der Ergebnisse	53
5.	Zusammenfassung	63
6.	Summary	65
7.	Literaturverzeichnis	67

1. Einleitung

Im Rahmen der Gütebewertung der Anlieferungsmilch wird in der Bundesrepublik Deutschland eine regelmäßige Untersuchung auf Hemmstoffe vorgenommen. Der hierfür eingesetzte Hemmstofftest erlaubt - mit Ausnahme der Penicilline - keine Identifizierung der in der Milch als Rückstandsbildner besonders zu beachtenden Antibiotika. Aus naheliegenden Gründen wäre in bestimmten Fällen jedoch eine Identifizierung von Antibiotika oder Antibiotika-Gruppen wünschenswert.

Meine Aufgabe war es, zu prüfen, ob verschiedene Antibiotika oder Antibiotika-Gruppen in der Milch mit Hilfe der Hochspannungs-Gel-Elektrophorese im interessierenden Konzentrationsbereich identifiziert werden können.

2. Schrifttum

2.1 Zur Identifizierung von Antibiotika in der Milch

Aus lebensmittelhygienischen und molkereitechnologischen Gründen ist es notwendig, die Milch auf Rückstände therapeutisch und prophylaktisch eingesetzter Antibiotika zu untersuchen. Hierzu stehen folgende Methoden zur Verfügung:

- a) mikrobiologische Nachweismethoden
- b) physikalisch-chemische Nachweismethoden
- c) kombinierte physikalisch-chemische und mikrobiologische Nachweismethoden

Mikrobiologische Nachweismethoden

Das Prinzip der mikrobiologischen Antibiotikanachweisverfahren beruht auf der negativen Beeinflussung des Wachstums oder der Stoffwechselaktivität von Testkeimen durch einen anwesenden Hemmstoff.

Nach MEYER et al. (1969) werden zwei mikrobiologische Nachweismethoden unterschieden:

Nachweis mit flüssigen Nährmedien

In einem flüssigen Nährmedium-Testkeimgemisch wird das Untersuchungsmaterial einer Bebrütung ausgesetzt. Eine Trübung oder bei Zusatz eines Farbindikators ein Farbumschlag zeigen das Fehlen oder Vorhandensein eines Hemmstoffes an.

Nachweis mit festen Nährmedien

Das auf ein mit Testkeimen versetzten Nährboden verbrachte antibiotikahaltige Probenmaterial führt nach Bebrütung zu einer Hemmzonenbildung infolge Unterdrückung des Keimwachstums (Agardiffusionstest). Auf Grund unterschiedlicher Probenauftragung werden folgende Techniken unterschieden:

Blättchentest (KELCH und CORETTI, 1959)

Lochtest (CORETTI, 1959)

Zylindertest (OBERZILL, 1962) und

Gefrierblocktest (GARTSIDE, 1960).

Für die Praxis der Hemmstoffuntersuchung bei Schlachttieren wird der Agardiffusionstest mit *B. subtilis* herangezogen.

In der routinemäßigen Untersuchung von Milch auf Hemmstoffe hat sich der von KRAACK und TOLLE (1969) entwickelte Brillant-schwarz-Reduktionstest als Screening-Test durchgesetzt. Ein schnelles Resultat, eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber Penicillinen und leichte Handhabung sind seine Vorteile. Jedoch ist er ebenso wie jeder andere Hemmstofftest nur in der Lage, das Vorhandensein eines Hemmstoffes anzuzeigen.

Mit diesen Methoden, einschließlich der Säuerungs- und Koagulationshemmung, wird jede beliebige, das mikrobielle Wachstum hemmende Substanz erfaßt, sofern sie die für das Testsystem erforderliche minimale Hemmkonzentration überschreitet.

Als einziger spezifischer mikrobiologischer Antibiotika-Nachweis ist der Nachweis Penicillinase-sensibler Penicilline anzusehen (KRAACK und TOLLE, 1969, International Dairy Federation, 1970). Das Spektrum wird erweitert durch die Erfassung Penicillinase-fester Penicilline in Rohmilch mit einer stark erhöhten Penicillinase-Dosis (GEDEK und BAATH, 1976) sowie durch *B. cereus*-Beta-Lactamase bei Cephalosporinen (GEDEK, 1977).

Physikalisch-chemische Nachweismethoden

Die Anwendung physikalisch-chemischer Methoden erfolgt meist zum Zweck des spezifischen Nachweises eines bestimmten Antibiotikums.

Jodometrie

Bei der von ALCINO (1946) zum Nachweis von Penicillin entwickelten Methode werden die durch Alkalihydrolyse gebildeten Penicillansäuren bzw. deren Hydrolysenzerfallsprodukte durch Jod oxidiert. Durch Ansäuern eines Penicillingemisches mit Amylacetat lassen sich halbsynthetische Penicilline, die auf Grund ihres Gehaltes an 6-Aminopenicillansäure jodometrisch miterfaßt werden, abtrennen.

Kolorimetrie

Im alkalischen Milieu wird Streptomycin zu Maltol abgebaut (SCHENK und SPIELMANN, 1945), das mit Eisen-III-Chlorid eine beständige Rotfärbung ergibt. Diese Reaktion wurde von BOXER et al. (1947) zur Bestimmung des Streptomycins herangezogen. Kolorimetrisch lassen sich Lösungen von Streptomycin und Dihydrostreptomycin durch Zugabe von Nitroprussidnatrium und rotem Blutlaugensalz trennen (MONASTERO, 1952).

GLAZKO et al. (1949) sowie OH-ISHI (1968) bestimmten kolorimetrisch Chloramphenicol, das über seine Nitrogruppe an einen Azofarbstoff gekoppelt wurde.

Gaschromatographie

Mit Hilfe der Gaschromatographie konnten Penicillin (EVRARD et al., 1964; HISHTA, 1971), Chloramphenicol (MARGOSIS, 1970; HAMANN et al., 1975) und auch Gemische von Neomycin B und C (TSUJI und ROBERTSON, 1969) identifiziert

und getrennt werden. Der Anwendungsbereich der gaschromatographischen Untersuchung beschränkt sich jedoch lediglich auf Substanzen, die sich in reproduzierbarer Weise verdampfen lassen.

Polarographie

Durch Polarographie bestimmten DOSCOCIL (1964) und CAPLIS et al. (1965) Chlortetracyclin und Oxytetracyclin. Die Methode besteht in der Auswertung von Strom-Spannungskurven, die unter Verwendung einer Quecksilbertropfelektrode als Arbeitselektrode erhalten werden. Aus der Lage der Kurve bezüglich der Potentialachse kann man auf die Art des Stoffes schließen. Die Höhe der Kurve ist der Konzentration des gesuchten Stoffes proportional (MOORE und HUMMEL, 1973). FOSSDAL und JAKOBSEN (1971) schlugen eine von ihnen entwickelte Methode zur Bestimmung von Chloramphenicol in der Milch vor.

Kombinierte physikalisch-chemische und mikrobiologische Nachweismethoden

Das Wesen kombinierter physikalisch-chemischer und mikrobiologischer Methoden gegenüber den anderen besteht darin, daß nur die antimikrobielle Wirkung eines Stoffes bestimmt wird, während eine Trennung der Wirkstoffe durch physikalisch-chemische Verfahren erfolgt. Diese Kombinationsverfahren finden in Form der Dünnschichtchromatographie und der Elektrophorese Anwendung.

Die unterschiedliche Löslichkeit der zu trennenden Substanzen in verschiedenen Laufmitteln wird bei der Dünnschichtchromatographie genutzt. Zur Trennung von Antibiotika werden vorzugsweise Celluloseschichtplatten verwendet. Die Sichtbarmachung gewandelter Antibiotika geschieht durch die anschließende

Überschichtung und Bebrütung der Platten mit einem geeigneten Nährboden-Testkeim-Gemisch. LANGNER et al. (1972, 1973a) und EBNER (1977) gelang es, mit dieser Methode verschiedene Antibiotika bzw. Antibiotika-Gruppen zu differenzieren.

2.2 Allgemeines über die Elektrophorese

Die Anwendung der Elektrophorese zur Trennung von Substanzgemischen wird schon seit vielen Jahrzehnten mit den verschiedensten Methoden praktiziert. Unter Elektro- oder Ionophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Auf Grund unterschiedlicher Ladung und Beweglichkeit können dabei mehrere Teilchenarten voneinander getrennt sowie analytisch bestimmt werden. Man arbeitet dazu entweder in freier Lösung in der Form der freien Elektrophorese nach TISELIUS (1937), wobei die Meßlösung beidseitig an eine Pufferlösung angrenzt oder man trägt die Meßlösung auf ein mit Puffer getränktes Trägermaterial in Form der Trägerelektrophorese auf. Als Träger wurden die verschiedensten Stoffe verwendet, wie Papier, Baumwolle, Celluloseacetat, Silicagel, Polyacrylamidgel, Stärke, Agar, Agarose usw. (DOSE, 1961; WIEME, 1965).

Je nach Anwendungsgebiet wurde seither eine Vielzahl von Begriffen zur Beschreibung der Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld geprägt. Während der Ausdruck Ionophorese gegen Ende des vorigen Jahrhunderts vor allem für die Wanderung kleiner anorganischer Ionen eingeführt wurde (DOSE, 1961), benutzte man den Ausdruck Elektrophorese für die Wanderung geladener Makromolekeln im elektrischen Feld. Die Kataphorese (HARDY, 1905) bezeichnet als Sonderform der Elektrophorese die Wanderung positiv geladener Kolloidteilchen zur Katode.

In vielen Arbeitskreisen hat sich die Bezeichnung Elektropherographie (DOSE, 1961) für den elektrophoretischen Trennungsvorgang unter Verwendung eines Trägers durchgesetzt. Der Name des jeweiligen Trägers wird als Präfix vorangesetzt. Entsprechend der Chromatographie spricht man von dem aufgezeichneten Ergebnis einer Elektropherographie als einem Elektropherogramm.

Im angelsächsischen Sprachgebrauch wird heute jedoch weitgehend von "electrophoresis" mit dem entsprechenden Präfix gesprochen.

In der freien Elektrophorese lassen sich die Grundvoraussetzungen für die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld und ihre Beziehung zueinander leichter bestimmen als in der Trägerelektrophorese. Eine exakte Berechnung bestimmter Größen ist in der Elektropherographie auf Grund vielfach nicht als bekannt vorauszusetzender wichtiger Dissoziationskonstanten häufig nicht möglich. Man muß sich daher in solchen Fällen oder bei der Untersuchung von Makromolekülen oft mit empirischen Erkenntnissen begnügen.

So setzt sich die Wanderungsgeschwindigkeit einer Ionenart in einem trägerfreien Elektrolyten aus Ladung, Größe und Hydratation sowie der elektrischen Feldstärke und der Viskosität des Mediums zusammen. Dabei versteht man unter Hydratation (Solvation) die Eigenschaft von Ionen, sich in wässrigen Lösungen mit einer Hydrathülle zu umgeben. Der durch die Hydrathülle bedingte größere Teilchenradius ist entsprechend zu berücksichtigen.

Als elektrische Feldstärke bezeichnet man die Kraft, die an einem Feldpunkt auf ein geladenes Teilchen einwirkt. Sie wird in V/cm angegeben.

Die Wanderungsgeschwindigkeit niedermolekularer Verbindungen, die bei den gewöhnlich benutzten pH-Werten nur teilweise dissoziiert sind, zeigen zudem eine deutliche Abhängigkeit vom betreffenden pH-Wert (DOSE, 1961). Das Trennergebnis ist somit durch geschickte Wahl des pH-Wertes beeinflussbar.

Die Ionenstärke des Puffers beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen dadurch, daß mit zunehmender Konzentration des Elektrolyten bei konstantem Potentialgradienten die elektrische Feldstärke und somit die Wanderungsgeschwindigkeit abnehmen.

Mit der Salzkonzentration steigt auch die Viskosität und sinkt umgekehrt mit steigender Temperatur. Hierdurch werden sowohl die elektrochemische Wanderungsgeschwindigkeit wie auch die Diffusionsgeschwindigkeit im gleichen Sinne beeinflusst.

Im allgemeinen beobachtet man bei der Trägerelektrophorese kleinere Wanderungsgeschwindigkeiten als bei der freien Elektrophorese. Dies ergibt sich durch den größeren Weg, den das geladene Teilchen zurückzulegen hat, wenn es die Hindernisse des Trägers umwandert. Durch das fortwährende Anstoßen der bewegten Teilchen an die Moleküle des Trägers, bei dem die Ladungsträger einen Teil ihrer kinetischen Energie abgeben, entsteht Wärme. Nach dem JOULE'schen Gesetz (1841) ist die Beziehung gegeben, daß in einem stromdurchflossenen Leiter die Wärme (Q) der Größe des Widerstandes (R), der Zeit (t) und dem Quadrat der Stromstärke (I) proportional ist ($Q = R \times t \times I^2$). Diese Wärmeentwicklung hat zur Folge, daß der Puffer im Träger verdampft und infolge der Kapillarwirkung des Trägermaterials beidseitig von den Elektrodengefäßen her zur Mitte des Trägers nachströmt (Schwemmeffekt (DOSE, 1961)). Dadurch ergibt sich eine unerwünschte Anreicherung von Pufferionen in der Mitte des Trägermediums.

Ein Umstand, der die Wanderungsgeschwindigkeit und in manchen Fällen sogar die Wanderungsrichtung der aufzutrennenden Stoffe verändert, liegt in der Elektroosmose (Endosmose). Das elektrolytische Medium (Wasser) lädt sich gegenüber dem porösen Trägermaterial auf, so daß unmittelbar nach Anlegen der Spannung ein langsamer Strom des Mediums (Wasser) zu einer der Elektroden einsetzt. Die Elektroosmose ist bei wässrigen Elektrolyten meist zur Katode gerichtet. Bei der Papier-Elektrophorese nimmt die zur Katode gerichtete Elektroosmose mit steigendem pH-Wert zu (DOSE, 1961). Allgemein hängt die Endosmose von den Eigenschaften des Trägermaterials und den Ionen des Elektrolyten ab. Erhöhte Ladung und steigende Ionenkonzentration führen grundsätzlich zu einer Verstärkung der Elektroosmose. Geladene Teilchen wandern so weit, wie ihre wahre Wanderungsgeschwindigkeit durch eine entgegengesetzte Flüssigkeitsströmung (entstanden durch Elektroosmose oder Schwemmeffekt) kompensiert bzw. durch eine gleichgerichtete Strömung ergänzt wird. Unter diesen Umständen ist die beobachtete Wanderungsgeschwindigkeit in keinem Teil des Trägers konstant.

Durch Kühlung des Trägermaterials während des Trennungsvorganges läßt sich die Verdampfung und somit der Schwemmeffekt fast vollständig unterdrücken. Man hat schon lange in der Papier-elektropherographie versucht, mit Hilfe von hydrophoben Flüssigkeiten wie Chlorbenzol, Toluol, Kohlenstofftetrachlorid, Chloroform usw. in die der Papierträger während der Trennung eingetaucht wird, die entstehende Wärme abzuführen und der Aufnahme von Pufferlösung in den Träger entgegenzuwirken (DOSE, 1961). Das Arbeiten mit hydrophoben Flüssigkeiten ist jedoch etwas umständlich und wegen der leichten Entzündbarkeit der Kühlmittel (bei Lichtbogenbildung) sowie eventueller Interferenz mit den aufzutrennenden Substanzen (Proteine kön-

nen z.B. denaturiert werden) vermeidet man heute weitgehend diese Methode. Dagegen hat sich die Kontaktkühlung, bei der Kühlflüssigkeit und Trägermedium durch eine Platte aus Glas oder Kunststoff getrennt werden, wegen seiner problemlosen Handhabung durchgesetzt.

Als Flüssigkeitsbremse gegen die Pufferwanderung aus den Elektrodenbecken läßt sich ein von WEBER (1951) entwickeltes Cellophan-Diaphragma anwenden. Hierbei wird in einen in der Mitte gefalteten Cellophanstreifen ein gleichgroßes Stück Filterpapier oder Leinwand eingelegt. Das untere Ende des Filterpapiers taucht frei in die Pufferlösung des Elektrolytgefäßes, während das von Cellophan umschlossene Ende auf dem Träger aufliegt.

Als weitere störende Erscheinung zeigt sich die Adsorption bestimmter zu trennender Substanzen an den Träger -tailing- (DOSE, 1961; WIEME, 1965). Im allgemeinen sind jedoch die zur Trägerelektropherographie verwendeten Trägermaterialien wenig oberflächenaktiv. Der Effekt läßt sich z.B. bei den in der Papier-Elektropherographie dafür verantwortlichen polyvalenten Kationen (Ca^{++} , Fe^{+++} , Cu^{++}) durch den Zusatz geeigneter Komplexbildner (Triäthanolamin usw.) zumindest teilweise beseitigen.

Der pH-Wert des Trägermediums bestimmt weitgehend den Dissoziationsgrad der zu untersuchenden Substanzen (DOSE, 1961). Damit wird gleichzeitig ein Maßstab für die Wanderungsrichtung (z.B. bei Makromolekülen), Wanderungsgeschwindigkeit und Nachweisempfindlichkeit des jeweiligen Stoffes festgelegt. So bedingt z.B. die Verschiebung des pH-Wertes mehr auf die saure Seite des I.P. eine positive Nettoladung eines Ampholyten, die Substanz wandert somit katodisch und umgekehrt (LANGNER, 1973c).

Frühzeitig war man bemüht, die Trennzeit zu verkürzen und so die bei der Trägerelektrophorese auftretende Verbreiterung einzelner Zonen in Grenzen zu halten. MICHL (1951) verwendete bereits Potentialgefälle bis 50 V/cm. Um bei großen Laufstrecken zu derartig hohen Feldstärken zu gelangen, war es erforderlich, die Spannung entsprechend zu erhöhen. Bei solchen Hochspannungs-Elektrophoresen ist die Kühlung des Laufmediums unerlässlich.

In der Elektrophorese-Technik werden verschiedenste Trennverfahren angewandt. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen

- dem kontinuierlichen Verfahren (J.St.L. PHILPOT, 1940; H. SVENSSON und I. BRATTSTEN, 1949; W. GRASSMANN und H. HANNIG, 1950; R. DOBRY und R.K. FINN, 1958; J. BAROLLIER, E. WATZKE und H. GILIAN, 1958), bei dem ständig neues Substanzgemisch zugeleitet wird, das mit dem Pufferstrom senkrecht zu der angelegten Spannung das elektrische Feld durchströmt, sowie
- der diskontinuierlichen Trennung, bei der das Substanzgemisch vor Anlegen der Spannung einmalig dem Träger zugegeben wird (DOSE, 1961).

In Fällen nicht eindeutiger Differenzierung kann durch die Anwendung der zweidimensionalen Elektrophorese ein besseres Trennergebnis erzielt werden. Hierzu wird nach erfolgter erster elektrophoretischer Trennung das Medium einem zweiten elektrischen Feld ausgesetzt, das im rechten Winkel zum vorangegangenen liegt. Diese zweite Ablenkung bereits gewandelter Zonen ermöglicht eine eindeutige Bestimmung der Substanzen (DURRUM, 1950, 1951).

2.3 Elektrophoretische Differenzierung von Antibiotika

Die Problematik der elektrophoretischen Trennung von Antibiotikagemischen findet in einer Reihe beschriebener Methoden ihren Ausdruck (GRYNNE, 1973; LANGNER et al., 1973 a, c; LIGHTBOWN und de ROSSI, 1965; MAEDA et al., 1969; MARTEN, 1964; RIEVE et al., 1974; ROTH, 1971, 1974; SCHMIDHOFER und EGLI, 1974; THOMAS und BROADBRIDGE, 1970). In vielen Fällen werden unterschiedliche physikalische und chemische Parameter als Orientierungsgrößen zugrunde gelegt, wodurch der Vergleich der einzelnen Verfahren und der erzielten Ergebnisse erschwert wird.

In den 60er Jahren (MARTEN, 1964; MAEDA et al., 1969) wurde die Elektrophorese zur Trennung von Antibiotikagemischen mit gepufferten Reinsubstanzen sowie in körpereigenen Geweben und Flüssigkeiten erstmalig herangezogen. Allgemein üblich ist bisher die Auftrennung organisch lösbarer Antibiotika mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie (IKEKAWA et al., 1963; ASZALOS et al., 1968; KATAYAMA und IKEDA, 1969; LANGNER et al., 1972, 1973a) sowie wasserlöslicher Antibiotika durch Papier-Chromatographie (ISHIDA et al., 1952; SNELL et al., 1956; KONDO et al., 1964). Beide Verfahren sind zeitaufwendig und werden stark durch die Reinheit der Probe, besonders durch anorganische Salze beeinflusst.

2.3.1 Hochspannungs-Papier-Elektrophorese

MAEDA et al. (1969) beschrieben eine Hochspannungs-Papier-Elektrophorese zur Trennung von Antibiotika mit einer 15minütigen Trennung, die besonders für wasserlösliche basische oder amphotere Hemmstoffe geeignet ist. Sie verwendeten ein

handelsübliches Hochspannungs-Elektrophoresegerät (HV 5000-3, SERVANT INSTRUMENTS). Die Probelösung wurde auf Filterpapierstreifen (TOYO Nr. 51) der Größe 60 x 15 cm im Abstand von 16 cm von dem einen Streifenende weg aufgetropft. Das Filterpapier wurde entsprechend den Angaben von ATFIELD und MORRIS (1961) gleichmäßig mit einem Ameisensäure-Essigsäure-Wasser-Gemisch (22 : 75 : 900) pH 1,8 eingesprüht. Ein konstanter Strom (ca. 40 mA/15 cm) bei 3300 V wirkte für 15 Minuten auf den Papierstreifen ein. Nach der Elektrophorese wurde die Elektrolytlösung im warmen Luftstrom verdampft. Mit verschiedenen Testorganismen wie *St. aureus*, *Micrococcus flavus*, *B. subtilis* oder *E. coli* wurden durch Bioautographie Hemmstoffe auf dem Papierstreifen sichtbar gemacht. Als Bezugssubstanz unter Standardbedingungen diente Alanin (relative Beweglichkeit = 1,0), das ca. 10 cm katodenwärts wanderte. Mit dieser Methode wurden in 2 Gruppen entsprechend ihrer Extraktionseigenschaften 92 Antibiotika an Hand ihrer relativen Wanderungsstrecken gegenüber Alanin bestimmt.

2.3.2 Hochspannungs-Gel-Elektrophorese

Die Anwendung hoher Spannungen zur elektrophoretischen Trennung brachte eine Vielzahl von Problemen mit sich. Rasche Verdampfung des Puffers durch vermehrte JOULE'sche Wärme sowie verstärkte Elektroosmose hatten eine Inhomogenität des Trägermediums zur Folge.

Wesentlich besser konstant zu haltende Trennungsbedingungen als bei der Papier-Elektrophorese bot die Verwendung gelartiger Trägermedien bei gleichzeitiger Kühlung des Trägers (LIGHTBOWN und de ROSSI, 1965; THOMAS und BROADBRIDGE, 1970;

ROTH, 1971, 1974; GRYNNE, 1973; LANGNER et al., 1973a, c; RIEVE et al., 1974; SCHMIDHOFER und EGLI, 1974). Verglichen mit der Hochspannungs-Papier-Elektrophorese erforderte die Hochspannungs-Gel-Elektrophorese auf Grund der andersartigen Trägerstruktur wesentlich längere Trennzeiten.

LIGHTBOWN und de ROSSI (1965) führten eine Hochspannungs-Gel-Elektrophorese vor, deren durchschnittliche Laufzeit drei Stunden betrug bei einer angelegten Spannung von 2000 V. Als Trägermaterial verwendeten sie nach Prüfung mehrerer Trägermedien für ihre Standardmethode einen 2%igen Agar, der zu gleichen Volumenteilen mit Tris-maleat-Puffer pH 5,6 gepuffert war. Die Agarschichtdicke wurde auf 1,27 mm festgelegt. Als Pufferlösung zogen sie eine Tris-maleat-Lösung sowohl einer reinen Phosphat- als auch Acetat-Pufferung vor. Entsprechend der Elektrolytkonzentration des Gel-Puffers verdünnten sie den Elektrodenpuffer zu gleichen Teilen mit Wasser. Zur Kühlung der Platte während des Laufes benützten sie eine zirkulierende wässrige Ethylenglycol-Lösung (20 %ig), die in einem Wärmetauscher auf -8°C gekühlt wurde. Zum Nachweis der Antibiotika legten sie eine 2,5 mm starke, 2 %ige Nähragarschicht von pH 7,3 über das Laufmedium, die mit $2-3 \times 10^6$ Sporen *B. subtilis* (NCTC 8241) pro ml Nachweismedium beimpft war. Diese doppelschichtige Platte wurde bei 39°C für 18 Stunden bebrütet.

Zur Bestimmung von Penicillinen verwendeten sie eine modifizierte Methode mit *Sarc. lutea* (NCTC 8340) und einen Nachweisagar, dessen endgültiger pH-Wert 6,0 betrug. Zur dauerhaften Aufbewahrung der Elektropherogramme wurde die die Hemmzonen enthaltende Nachweisagarschicht in geeigneter Weise präpariert und getrocknet.

ROTH (1971) beschrieb eine hochspannungs-elektrophoretische Methode zur Trennung von mehreren Antibiotika mit Hilfe einer Phosphatpufferung. ROTH bezeichnete die Methode als "mikrobiologisch-chemisches Antibiotikanachweisverfahren" (M.C.-Test). Er verwendete für seine Untersuchungen das Hochspannungs-Elektrophorese-System der Fa. CAMAG zusammen mit einem Kühlaggregat der Fa. HAAKE. Als Trägermedium benutzte er eine 2 %ige Agarose (SERVA), die im Verhältnis 1 : 10 mit Sørensen-Puffer pH 5,5 auf den genannten pH-Wert gepuffert wurde. Die Schichtdicke betrug 2 mm. Die Auftragung der Reinsubstanzen erfolgte mittels Zylindertest mit einem Auftragsvolumen von 50 µl. Die Antibiotika-Reinsubstanzen wurden in Sørensen-Puffer pH 5,5 gelöst. Vergleichsweise konnte ein Kontrollgemisch auf den Elektrophoreseplatten mit eingesetzt werden. Die Untersuchung hemmstoffhaltiger Fleischproben wurde entsprechend dem Allgemeinen Hemmstofftest anhand tiefgefrorener, ausgestanzter Fleischzylinder durchgeführt.

Die Elektrophorese erfolgte für 2 Stunden bei 1000 V Spannung und entsprechend 40-50 mA. Die Kühlflüssigkeit hatte eine Temperatur von -5° C bis 10° C. Als Elektrodenpuffer benutzte er 10 %igen Sørensen-Puffer pH 5,5.

Die Überschichtung der Elektrophorese-Platten geschah mit einem Antibiotika-Nachweisagar, der mit 10^4 Sporen *B. subtilis* (BREMEN) pro ml Nachweismedium beimpft war und wahlweise mit Sørensen-Puffer pH 6,0 oder 8,0 eingestellt werden konnte. Die Bebrütung erfolgte bei 37° C für 16 bis 18 Stunden im Brutschrank.

Die beschriebene Methode erfuhr insofern Abänderungen (ROTH, 1974), als ROTH die pH-Werte der Laufmedien zwischen pH 2,0 und 12,0 variierte. Entsprechend der damit erreichten unter-

schiedlichen Ionendichten konnte er mit Spannungen bis zu 3000 V arbeiten und dementsprechende Laufzeitverkürzungen ausnützen. Weitere Differenzierungsmöglichkeiten ergaben sich durch den Zusatz von 10 ml Methanol zum Laufmedium. Mit dieser verbesserten Methode demonstrierte er die Differenzierung von 41 antibiotisch wirksamen Substanzen in 4 Gruppen.

Eine Verbesserung dieser Methoden im Hinblick auf die Trennschärfe besteht in der Erneuerung des Elektrodenpuffers nach der halben Laufzeit und gleichzeitiger Entfernung der Fleischproben von der Trennplatte (RIEVE et al., 1974). Die Temperatur der Kühlflüssigkeit betrug bei diesen Versuchen -2°C . Das Nachweismedium wurde gegenüber dem pH 5,5 gepufferten Laufmedium mit Sørensen-Puffer auf pH 6,5 eingestellt.

Neu ist die Einteilung der Elektrophorese-Platten in Bahnen (SCHMIDHOFER und EGLI, 1974). In den Grundzügen beziehen sich diese Arbeiten auf die von ROTH (1971) beschriebene Methode mit der Hochspannungs-Elektrophorese-Apparatur der Fa. CAMAG.

Die verwendeten Platten waren in 11 Bahnen unterteilt. 1 %ige Agarose (BEHRING), die zu 10 % mit Sørensen-Puffer pH 5,5 gepuffert war, diente als Laufmedium. Am geeignetsten erwies sich eine Laufzeit von 120 Minuten mit 1000 V bei einer Stromstärke von 15 bis 25 mA. Die Temperatur des Kühlmediums betrug dabei 0°C bis 3°C . Die Überschichtung des Laufmediums geschah in der gleichen Schichtdicke wie beim Laufmedium. Der Nachweisagar wurde wahlweise mit Sørensen-Puffer pH 6,0 bzw. 8,0 eingestellt und mit *B. subtilis*, *B. cereus*, *Sarc. lutea* sowie *Staph. aureus* beimpft. Auf die Verwendung gleichen Homogenisates bei der Herstellung von Testsubstanzen (Matrix z.B. Niere, Ei, Muskulatur usw.) wurde besonderer Wert gelegt.

Die Einteilung in Bahnen zeigte für SCHMIDHOFER und EGLI folgende Vorzüge:

- . Es können mehrere Proben aufgetragen werden.
- . Nebeneinanderliegende Hemmzonen können nicht konfluieren.
- . Durch die eingeschränkte Diffusion werden die Nachweisgrenzen erhöht.
- . Auf einer Platte können mehrere Testkeime nebeneinander eingesetzt werden.

2.3.3 Niederspannungs-Gel-Elektrophorese

Die Antibiotikadifferenzierung von GRYNNE (1973) basiert auf drei Prinzipien:

- . unterschiedliche Wanderungstrecken
- . variierende Empfindlichkeit der verwendeten Testkeime
- . Beurteilung der Randschärfe und Form der Hemmflächen.

Ausgehend von den Erkenntnissen von LIGHTBOWN und de ROSSI (1965) sowie MARTEN (1964) benützte GRYNNE eine von JOHANSSON (1972) beschriebene Elektrophorese-Apparatur und -Technik mit 2 Platten von je 200 mm Länge. Das Probenauftragsvolumen wird mit 5 µl angegeben. Die Elektrophorese hatte eine Laufzeit bei 310 - 360 V von 30 - 45 Minuten. Als Trägermedium verwendete er 2 %igen DIFCO Bacto Agar, der zu 2,5 % wahlweise mit Phosphatpuffer pH 8,0 oder 6,5 gepuffert war. Der Elektrodenpuffer entsprach in Art und Molarität dem Gelpuffer. Zur Erkennung eventueller Irregularitäten während des Trennvorganges diente Bromphenolblau.

Nach beendetem Lauf wurde das Trägermedium entsprechend den aufgetragenen Proben in Streifen geschnitten und diese auf ein mit einem geeigneten Testkeim beimpftes Nachweismedium übertragen. Die Bebrütung dieser Platten erfolgte über Nacht bei einer dem Testkeim entsprechenden Brutschranktemperatur von 37°C bzw. 50°C . Es gelang mit dieser Methode 9 verschiedene Antibiotika gleichzeitig zu identifizieren.

Die Möglichkeit, die Trennzeit erheblich zu verkürzen, wurde von THOMAS und BROADBRIDGE (1970) zur Trennung von Penicillinen insofern genutzt, als sie geringere Laufstrecken bei höherer elektrischer Feldstärke in Kauf nahmen.

Sie beschreiben eine Niederspannungs-Elektrophorese-Apparatur, die es ihnen gestattete, mehrere 200 mm lange geltragende Platten gleichzeitig aufzulegen. Die dabei verwendete extrem große Menge von 10 l Elektrolytpufferlösung verminderte den Konzentrationseffekt in den Elektrodenbecken während der Elektrophorese. Bei einer Laufzeit von gewöhnlich 30 Minuten arbeiteten sie mit einer Feldstärke von 2 Vmm^{-1} . Die Stromstärke blieb konstant bei ca. 18 mA. Die Auftragsvolumina der Testlösungen schwankten zwischen 1 und 10 μl . Das Nachweismedium wurde bei einem pH-Wert von 7,0 mit Sporen von *B. subtilis* (ICI 2/4) entsprechend den Arbeiten von LIGHTBOWN und de ROSSI (1965) beimpft und 18 Stunden lang bei 37°C bebrütet.

Noch kürzere Trennzeiten wurden von LANGNER et al. (1973a, 1973c) für sein als "Kurzzeit-Niederspannungs-Elektrophorese" bezeichnetes Verfahren angegeben. Die Trennung wurde auf mit Agarose beschichteten Mikroskop-Objektträgern durchgeführt. Abweichend von der von ROTH (1971) beschriebenen Methode wurden die Objektträger in einer Schichtdicke von 1,7 mm

mit 1,5 %iger Agarose beschichtet. Das Laufmedium wurde im Verhältnis 1 : 4 mit Sørensen-Puffer pH 5,5 versetzt. Die Trennung erfolgte mit einer Spannung von 450 V und der entsprechenden Feldstärke von 50 V/cm. Die Gel-Schicht wurde mit Petroläther auf 4° C gekühlt. Als Elektrodenpuffer diente 0,067 molarer Phosphatpuffer pH 5,5.

Da man sich bei dieser Methode mit kurzen Laufstrecken begnügte, variierten die Trennzeiten entsprechend dem Antibiotikum zwischen 5 und 45 Minuten. Die Überschichtung der Trennplatten geschah mit Iso-Agar pH 6,0 und 8,0 sowie Tris-Agar pH 8,0, dem 10^4 Sporen von *B. subtilis* ATCC 6633 pro ml Nachweismedium zugesetzt wurden. Die anschließende Bebrütung erfolgte bei 37° C für 18 Stunden.

Mit Ausnahme der Cycline, die als nicht weiter aufteilbare Gruppe erschienen, wurde mit diesem eindimensionalen Verfahren die Trennung aller Antibiotika als theoretisch möglich dargestellt.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Hochspannungs-Elektrophorese-Apparatur

Die Hochspannungs-Elektrophorese-Apparatur (HÖLZEL, Dorfen) hatte folgende technische Daten:

0 - 10 000 V stufenlos regulierbar

0 - 200 mA

Größe der Trennkammer: 50 x 40 cm

Arbeitsfläche mit mitgelieferter Isolierfolie überzogen
Eingebautes Kühlaggregat.

Um die Schwierigkeiten zu vermeiden, die beim Kühlen der Elektrophoreseplatten mit leicht entzündbaren Kühlflüssigkeiten auftreten können, wurde für die eigenen Untersuchungen ein Gerät herangezogen, bei dem ein geschlossenes, eingebautes Kühlsystem (Kontaktkühlung) für eine konstante Kühltemperatur des Trennkammerbodens sorgte. Wegen der zu erwartenden relativ großen Antibiotika-Hemmzonen und der dadurch zwangsweise vergrößerten Wanderungstrecken wurde Wert auf eine entsprechende Trennkammerlänge gelegt.

3.1.2 Zubehör

Plattensysteme

Platten mit Bahneinteilung nach SCHMIDHOFER und EGLI (1973, 1974)

Grundplatte	560 x 200 x 2 mm	Fensterglas
2 Längsrandstreifen	560 x 18 x 5 mm	Akrylglas
2 Querrandstreifen	165 x 15 x 3 mm	Akrylglas
9 Silikonkautschuk- streifen	470 x 4 x 3 mm	
Abdeckplatte	560 x 200 x 3 mm	Fensterglas

Die Randstreifen waren mit Araldit (CIBA GEIGY) auf die Grundplatte geklebt.

2 Platten pro Arbeitsfläche.

Platten ohne Bahneinteilung

Grundplatte	560 x 150 x 2 mm	Fensterglas
2 Längsrandstreifen	560 x 15 x 5 mm	Akrylglas
2 Querrandstreifen	120 x 15 x 3 mm	Akrylglas
Abdeckplatte	560 x 150 x 3 mm	Fensterglas
Randstreifen mit Araldit verklebt		
3 Platten pro Arbeitsfläche.		

Glaszylinder aus Rohrglas (Eigenherstellung)

Aus Rohrglas, 3 mm Innendurchmesser, wurden mehrere 5 mm hohe Glaszylinder geschnitten und auf einer Seite plan geschliffen.

Stromübertragungsbrücken (Eingeherstellung)

Zur Vermeidung von Kriechströmen wurden aus der vom Gerätehersteller mitgelieferten Kunststoff-Isolierfolie Brücken in der Größe von 12 x 13 cm geschnitten. Sie wurden etwa in der Mitte rechtwinklig geknickt.

Stromübertragungstreifen (Eigenanfertigung)

Filterpapier wurde auf die Größe 24 x 14 cm zurechtgeschnitten und in der Mitte gefaltet (doppelte Lage 12 x 14 cm). An einer Schmalseite wurde der Umschlag ca. 2 cm tief eingeschnitten (Auflage auf Plattenrand).

Peleusball

zum Füllen der Glasbrücken zwischen den Puffertrögen.

Unterlegschablone (Eigenanfertigung)

Aus festem Karton wurde eine Schablone zur Markierung der Probenauftragungspunkte und zur besseren Sichtbarmachung der Hemmzonen (Rückseite mit schwarzer Seite) gefertigt. Die Schablone besaß die Plattenmaße 56 x 15 cm.

3.1.3 Laufmedien

Als Laufmedien wurde erprobt:

- . Agarose OREO 14/15 (BEHRING)
- . Agar Noble (DIFCO)
- . Antibiotic Medium 1 (DIFCO) pH 6,6 für die Testkeime *Sarc. lutea* und *B. cereus*
- . Testagar pH 8,0 (MERCK) für den Testkeim *B. subtilis*.

Die Beschichtung der Platten mit Bahneinteilung erfolgte ausnahmslos mit Agarose.

Die Platten ohne Bahneinteilung wurden sowohl mit Agarose als auch mit bereits mit Testorganismen beimpften Nachweismedien (Antibiotic Medium 1, Testagar pH 8,0) und Agar Noble überschichtet.

Pufferung des Laufmediums

Zur Pufferung sowohl der Laufmedien wie auch der Elektrodenpuffer wurde Phosphatpuffer und ein Tris-Phosphatpuffer-Gemisch verwendet. Die Grundlage bildete 1/15 molarer Phosphatpuffer nach Sørensen. Die einzelnen Pufferbedingungen der Laufmedien sind jeweils gesondert angegeben.

Beeinflussung der Elektrolytkonzentration des Laufmediums

Die Zusammensetzung der Trenngele variierte im Hinblick auf folgende Faktoren:

- . Konsistenz des verwendeten Agars
- . Molarität des Gelpuffers
- . Prozentualer Anteil des Puffers am Laufmedium
- . pH-Wert des Puffers bzw. Laufmediums
- . Schichtdicke des Laufmediums

Die Angaben über die Zusammensetzung der Trennmedien sind für dargestellte Versuche gesondert angegeben.

3.1.4 Antibiotika-Reinsubstanzen

Nachstehende Testsubstanzen wurden verwendet:

Chloramphenicol (BAYER), 98,9 %

Erythromycin - Thiocyanat (ABBOTT), 750 µg/mg

Neomycin - Sulfat (PFIZER), 734 µg/mg

Penicillin G - Na (HOECHST), 1650 I.E./mg

Rifamycin - SV - Na (GRÜNENTHAL), 808 µg/mg

Dihydrostreptomycin - Sulfat (PFIZER), 765 µg/mg

Tetracyclin - HCl (LEDERLE), 1000 µg/mg

Oxytetracyclin - HCl (PFIZER), 904 µg/mg

Chlortetracyclin - HCl (LEDERLE), 960 µg/mg

Die Antibiotika-Reinsubstanzen wurden bei 3° C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.1.5 Testkeime und Antibiotikanachweismedien

Als Testkeime wurden

Sarcina lutea (ATCC 9341)

Bacillus subtilis (BGA) und

Bacillus cereus (ATCC 11778) verwendet.

Die *Bacillus*-Sporen wurden entsprechend Anlage 4 zu § 20 Abs.4 AB.A vom 05.01.1974 hergestellt. *Sarc. lutea* wurde auf Schrägagar gehalten und alle zwei Monate auf Blutplatten überimpft.

Die *B. subtilis*-Sporensuspension (4×10^7 Sporen/ml) wurde bei 3° C mehrere Monate im Kühlschrank aufbewahrt. Die *B. cereus*-Sporensuspension (1×10^7 Sporen/ml) wurde ebenfalls mehrere Monate im Kühlschrank gehalten.

Folgende Antibiotikanachweismedien kamen zur Anwendung:

- . Antibiotic Medium 1 (DIFCO) pH 6,6
- . Testagar (MERCK) pH 8,0

Die Nachweismedien wurden jeweils vor Gebrauch frisch zubereitet.

3.1.6 Verschiedene Geräte und Materialien

- . Schüttler VORTEX-GENIE (WYLTEN und Co., Holland)
- . pH-Meter DIGITALMETER DIGI 610 (WTW, Wertheim)
- . Analysenwaage Typ 2442 (SARTORIUS)
- . Mikrowellenofen MICROMAT 600 (AEG)
- . Brutschrank (MEMMERT)
- . Heizbad POLYTHERM (DINKELBERG)
- . nivellierbarer Gießtisch (Eigenanfertigung)
- . Wellen-Wasserwaage (HOFFMANN)
- . Kühlschrank zum Lagern beschichteter Platten (LINDE)
- . -20° C-Gefrierschrank (BOSCH)
- . Mikropipetten a) Typ SAHLI 20 µl
b) EPPENDORFF 10, 20, 50, 200 µl
- . Antibiotikatestblättchen (SCHLEICHER und SCHÜLL)
 - a) 12,7 mm Ø
 - b) 9 mm Ø
- . pH-Meßstreifen (pH 5,2-6,7 und 6,6-8,7) LYPHAN
- . Farbindikatoren

Farbindikatoren

Zur Erkennung eventueller Unregelmäßigkeiten während der elektrophoretischen Trennung wurden Farbindikatoren eingesetzt (GRYNNE, 1973). Die Farbstoffe Bromphenolblau (0,05 %ig,

pH 3,0 - 4,6) und Bromthymolblau (1,0 %ig, pH 6,0 - 7,6) wurden mit Mikropipetten (EPPENDORFF) bei einem Auftragsvolumen von 10 μ l in der Auftragslinie zwischen zwei Milchproben oder am Plattenrand auf den Agar aufgetropft. Binnen fünf Minuten waren sie in das Laufmedium diffundiert.

3.2 Methodik

3.2.1 Physikalisch-chemische Trennung

3.2.1.1 Präparation der Laufmedien

Grundsätzlich wurden alle verwendeten Laufmedien mit dem entsprechenden Pufferzusatz 20 Minuten bei 120^o C autoklaviert und anschließend der gewünschte pH-Wert mit 1N NaOH bzw. 1N HCl eingestellt. Das noch heiße Medium wurde entweder sofort für die Beschichtung der Platten verwendet oder in entsprechende Portionen abgefüllt und nach dem Erstarren bei Zimmertemperatur im Kühlschrank bei 3^o C aufbewahrt. Die gegossenen Platten wurden möglichst am nächsten Tag verwendet, wenn der Agar genügend gefestigt war. Größere Mengen in verschraubten Gläsern abgefüllten Agars wurden bis zu 4 Wochen im Kühlschrank gelagert. Bei Bedarf wurde das erstarrte Laufmedium im Mikrowellenofen verflüssigt und der pH-Wert nochmals kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Anschließend wurde der Agar bis zum Beschichten der Platten bei 80^o C im Heizbad flüssig gehalten.

3.2.1.2 Beschichtung der Elektrophoreseplatten

Das Beschichten der Trennplatten mit dem Laufmedium erfolgte auf einem nivellierbaren, Resopal-beschichteten, hölzernen Gießtisch. Die Tischplatte besaß die Flächen-

ausmaße 50 x 100 cm. Vor dem Beschichten wurden die Trennplatten mit einem Spülmittel gereinigt, mit destilliertem Wasser nachgespült und im Brutschrank bei ca. 60° C getrocknet und vorgewärmt. Der Gießtisch wurde mit Hilfe einer Wasserwaage nivelliert. Das vorbereitete und im Wärmebad bei 80° C flüssig gehaltene Laufmedium wurde entsprechend der gewünschten Schichtdicke in Meßzylinder abgefüllt. Die vorgewärmte Platte wurde auf den Gießtisch gelegt und mit dem Laufmedium beschickt.

Bei geringen Schichtdicken mußte darauf geachtet werden, daß zunächst die anliegenden Randstreifen mit dem Gießmittel benetzt wurden und erst anschließend die Plattenmitte. Die auf Grund der Kohäsion des Agars freigebliebenen Stellen wurden mit dem Meßzylinder mit flüssigem Agar benetzt. Luftblasen wurden mit der Flamme des Bunsenbrenners entfernt.

Die gegossenen Platten wurden mit einer Abdeckplatte versehen. Das Erstarren des Agars bei Zimmertemperatur dauerte ca. 10 Minuten.

3.2.1.3 Präparation der Antibiotika-Reinsubstanzen

Die Reinsubstanzen wurden nach dem von der Food and Drug Administration (1968) empfohlenen internationalen Standard gepuffert und eingestellt. Die weitere Verdünnung geschah, wenn im Versuch nicht anders erläutert, mit Magermilch.

Chloramphenicol (BAYER), Wertigkeit 98,9 %

10,1 mg + 0,5 ml Methanol + 9,5 ml Sørensen-Puffer pH 6,0 ergaben 1000 µg/ml.

Erythromycin-Thiocyanat (ABBOTT), Wertigkeit 750 µg/mg
42,7 mg + 2,0 ml Methanol + 2,0 ml 0,1 molarer Phosphat-
puffer 8,0 ergaben 8000 µg/ml.

Neomycin-Sulfat (PFIZER), Wertigkeit 734 µg/mg
40,9 mg + 30 ml Sørensen-Puffer pH 8,0 ergaben 1000 µg/ml.

Penicillin_G-Na (HOECHST), Wertigkeit 1650 I.E./mg
Ampulle mit 10 000 I.E. + 10 ml 1 %iger Phosphatpuffer
pH 6,0 ergab 1 000 I.E./ml.

Rifamycin-SV-Na (GRÜNENTHAL), Wertigkeit 808 µg/mg
12,37 mg + 1,0 ml Methanol + 9,0 ml 1 %iger Phosphatpuffer
pH 6,0 ergaben 1 000 µg/ml.

Dihydrostreptomycin-Sulfat (PFIZER), Wertigkeit 765 µg/mg
41,2 mg + 30 ml destilliertes Wasser ergaben 1 000 µg/ml.

Tetracyclin-HCl (LEDERLE), Wertigkeit 1 000 µg/mg
30 mg + 30 ml Sørensen-Puffer pH 6,0 ergaben 1 000 µg/ml.

Oxytetracyclin-HCl (PFIZER), Wertigkeit 904 µg/mg
53,1 mg + 10 ml 0,1 N HCl ergaben 4 800 µg/ml.

Chlortetracyclin-HCl (LEDERLE), Wertigkeit 960 µg/mg
31,2 mg + 30 ml Sørensen-Puffer pH 6,0 ergaben 1 000 µg/ml.

Medium für die Testsubstanzen

Als Matrix für die Testsubstanzen wurde sowohl Rohmilch als
auch Magermilch verwendet.

Zur Gewinnung von Magermilch wurde Rohmilch bei 3 000 U/Min. zentrifugiert, entrahmt und in Flaschen abgefüllt. Zur Entkeimung wurden die Flaschen an drei aufeinander folgenden Tagen für je eine Stunde im Dampftopf erhitzt.

Kontrollproben

Kontrollproben wurden jeweils als Einzelproben einer Substanz (Matrix = Rohmilch oder Magermilch) oder als Mischproben mehrerer Substanzen eingesetzt. Es wurde darauf geachtet, daß jeweils optimal nachweisbare Konzentrationen verwendet wurden. Die Mischproben setzten sich aus gleichen Volumenanteilen mehrerer (n) Testsubstanz-Einzelproben zusammen, wobei der n-fachen Verdünnung entsprechend Rechnung getragen wurde.

3.2.1.4 Probenauftragung

Die Probenauftragslinie wurde entsprechend dem Verteilungsmuster der Antibiotika 18,5 cm vom anodenseitigen Plattenrand entfernt gewählt.

Drei Testsysteme wurden auf ihre Verwendbarkeit hin untersucht.

Zylindertest

Die selbstgefertigten Zylinder wurden vorsichtig an den vorgesehenen Auftragungsorten mit einer Pinzette auf das Laufmedium aufgesetzt. Die Geloberfläche sollte dabei nicht beschädigt werden.

Lochtest

Korkbohrer im Durchmesser von 4, 8 und 10 mm wurden benützt. Die Löcher wurden nach Festigung des Agars an den Auftragsstellen ausgestanzt und die Gelscheiben mit einer Drahtöse ausgehoben.

Blättchentest

Die Testblättchen (SCHLEICHER und SCHÜLL), Ø 12,7 mm und 9,0 mm fanden Verwendung. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Testblättchen zu zwei Drittel in die Probelösung eingetaucht, leicht abgestreift und unter sanftem Andruck an den Auftragsorten aufgelegt.

Wegen ihrer geringen Feuchtigkeitsaufnahme wurden die Testblättchen mit Ø 9,0 mm durchwegs in doppelter Lage verwendet.

Vordiffusion

Zur Verringerung der Artefaktbildung im Trenngel am Auftragsort wurden die Testblättchen lediglich für eine Diffusionszeit von einer und zwei Stunden aufgelegt und vor dem Trennungsvorgang wieder entfernt.

3.2.1.5 Trennungsvorgang

Feuchte Kammer

Zur Vermeidung der Austrocknung des Laufmediums während des Trennungsvorganges wurde die Elektrophorese in Form einer feuchten Kammer durchgeführt. Zu diesem Zweck war die Arbeitsfläche mit einem durchsichtigen Kunststoffdeckel verschließbar. Dadurch konnten die Platten auch während des Laufes be-

obachtet werden. Der Kammerdeckel war mit einer Gummidichtung versehen.

Kühlung

Das Kühlaggregat wurde so eingestellt, daß die im Gerät eingebaute Anzeige der Kühltemperatur mit der auf der Oberfläche der Arbeitsplatte gemessenen Temperatur übereinstimmte. Um Kühlverluste zwischen der Arbeitsplatte und den Trennplatten möglichst gering zu halten, wurden die Platten mit destilliertem Wasser unterfüttert.

Elektrodenpuffer

Für die Füllung der Puffertröge wurde, wenn im Versuch nicht anders erwähnt, der entsprechende Gel-Puffer im Verhältnis 1 : 10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Stromübertragungstreifen

Zur Stromübertragung wurden doppelte Filterpapierstreifen der Größe 12 x 14 cm benützt. Zur Vermeidung von Kriechströmen wurden die Stromübertragungstreifen über Brücken aus der vom Gerätehersteller gelieferten Isolierfolie gelegt. Die Papierstreifen wurden kurz vor dem Lauf im Elektrodenpuffer getränkt und zwischen Filterpapier leicht ausgedrückt.

Vorlauf und Trennung

In Fällen, bei denen mit Vorlauf gearbeitet wurde, wurden zunächst für fünf Minuten 500 V Spannung angelegt. Erst anschließend wurde die Spannung auf den gewünschten Spannungswert erhöht. Über die angelegten Spannungen, die erreichten Stromstärken, die Trennzeiten und die verwendeten Kühltemperaturen wird bei einzelnen Versuchen gesondert hingewiesen.

3.2.2 Bioautographie

Die bei den Versuchen verwendeten Antibiotika sollten von drei Testkeimen erfaßt werden. Drei Trennplatten pro Arbeitsfläche, die mit je einem Testkeim beimpft waren, gewährleisten für mindestens vier zu untersuchende Proben und eine Kontrolle bei physikalisch-chemisch identischen Bedingungen eine gute Vergleichs- und zusätzliche Differenzierungsmöglichkeit durch die unterschiedliche Testkeimempfindlichkeit. Als Testkeime wurden

- Sarc. lutea (ATCC 9341),
- B. subtilis (BGA) und
- B. cereus (ATCC 11 778) benutzt.

3.2.2.1 Testkeimsuspensionen

Zur Herstellung der Sarc. lutea-Testsuspension wurde Material von einer Kolonie mit einer Öse von der Blutplatte abgeimpft, in 10 ml Bouillon verbracht und 24 Stunden bei 30° C inkubiert. Die Bouillon wurde mit dem Schüttler gut suspendiert und die Trübung in Photometer bei 646 nm gemessen. Reine Bouillon entsprach einer Lichtdurchlässigkeit von 100 %. Eine Durchlässigkeit von 17 - 25 % entsprach etwa 10^6 Keimen/ml. 1 ml der Keimsuspension von 10^6 Keimen/ml auf 99 ml Nachweisagar ergab eine Keimzahl von 10^4 Keimen/ml im Nachweismedium.

0,1 ml B. subtilis-Sporensuspension (4×10^7 Sporen/ml) wurde auf 100 ml Nachweisagar gegeben und ergab eine Keimzahl von 4×10^4 Sporen/ml Nachweismedium.

0,1 ml *B. cereus*-Sporensuspension (1×10^7 Sporen/ml) wurde auf 100 ml Nachweisagar gegeben und ergab eine Keimzahl von 1×10^4 Sporen/ml Nachweismedium.

3.2.2.2 Antibiotikanachweismedien

Antibiotic Medium 1 (DIFCO) pH 6,6

3,05 g Agar wurden mit destilliertem Wasser ad 100 ml aufgefüllt und 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Der pH-Wert 6,6 wurde mit 1N HCl bzw. 1N NaOH korrigiert. Der Agar wurde im Wärmebad bei 65°C flüssig gehalten und zum Beimpfen und Überschichten der Trennplatten bei Verwendung von *Sarc. lutea* unter fließendem kaltem Wasser auf ca. 55°C abgekühlt. *B. subtilis* und *B. cereus* konnten bei 65°C heißem Agar verimpft werden.

Testagar pH 8,0 (MERCK)

2,5 g Agar wurden mit destilliertem Wasser ad 100 ml aufgefüllt und 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Der pH-Wert 8,0 wurde mit 1N HCl bzw. 1N NaOH korrigiert. Bis zum Beimpfen und Überschichten wurde der Agar bei 65°C im Wärmebad flüssig gehalten.

Das Gießen des Nachweismediums erfolgte in der gleichen Weise wie die Beschichtung mit dem Laufmedium. Lediglich die Temperatur des Mediums (55°C für *Sarc. lutea*, 65°C für die Bazillen) mußte der Temperaturempfindlichkeit des jeweiligen Testkeims angepaßt werden.

Gearbeitet wurde mit Schichtdicken von 1 mm, 1,5 mm und 2 mm.

Nach Erstarren des Agars bei Zimmertemperatur (ca. 10 Minuten) wurden die Platten abgedeckt und 16 Stunden bei 34° C bebrütet.

Antibiotikabouillon (MERCK) zur Herstellung der Testkeimsuspension von *Sarc. lutea*

17,5 g Antibiotikabouillon und destilliertes Wasser ad 1000 ml wurden 1 Stunde im Dampftopf gelöst und danach in Reagenzgläser in 10 ml-Portionen abgefüllt. Anschließend erfolgte Autoklavierung für 20 Minuten bei 120° C und Abkühlung bei Zimmertemperatur. Die verschlossenen Röhrchen wurden bei 3° C im Kühlschrank aufbewahrt.

0,9 %ige Kochsalzlösung zur Herstellung der Bazillen-Dauerkulturen

9 g NaCl (Tabletten von MERCK) und destilliertes Wasser ad 1000 ml wurden 20 Minuten bei 120° C autoklaviert, bei Zimmertemperatur abgekühlt und bei 3° C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.2.3 Nachweis von Antibiotika

Der Nachweis der Antibiotika wurde indirekt durch die Wachstumshemmung von Testbakterien geführt. Die Bebrütungstemperatur für die drei Testkeime

Sarc. lutea pH 6,6

B. subtilis pH 6,6 und 8,0 und

B. cereus pH 6,6 betrug einheitlich 34° C

bei einer Bebrütungsdauer von 16 Stunden.

3.2.2.4 Auswertung

Das Untersuchungsverfahren erfolgte in zwei Schritten:

1. physikalisch-chemische Trennung mit Hilfe der Hochspannungs-Gel-Elektrophorese
2. Sichtbarmachung der im elektrischen Feld gewanderten Antibiotika mit Hilfe von Testkeimen.

Die Differenzierung der Hemmstoffe erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten:

- . Wanderungsrichtung (katodisch oder anodisch)
- . gewanderte Strecke (bezeichnet als f-Wert in mm) im Vergleich mit einer eingesetzten Kontrollsubstanz bei annähernd gleichgroßen Hemmzonen
- . Testkeimpfindlichkeit (Hemmzonen-Größenvergleich bei drei Testkeimen im sauren und alkalischen pH-Bereich). Gemessen wurde der Hemmzonenlängsdurchmesser in mm.
- . Hemmflächenform (rund, ovoid, streifenförmig)
- . Hemmzonenrandschärfe (subjektiv).

Nach der Bebrütung wurden die Platten für ca. 15 Minuten zur Auskühlung und um das Kondenswasser auf der Abdeckplattenunterseite abtrocknen zu lassen aufgedeckt. Nach erneutem Abdecken konnten die entstandenen Hemmzonen gegen eine schwarze Unterlage gut auf der Oberseite der Abdeckplatten mit Filzstift aufgezeichnet werden. Anschließend wurde die Photokopie einer maßstabsgleichen Zeichnung der Trägerplatte auf die Oberseite der Abdeckplatte mit Klebstreifen geheftet und die im Gegenlicht durchscheinenden Hemmzonen noch-

mals auf die Photokopie übertragen. Ein solches Protokoll stellte die maßstabgerechte Aufzeichnung des Trennergebnisses dar. Einzelheiten über physikalische, chemische und autobiographische Besonderheiten wurden am Rande des Protokolls vermerkt. Um nicht auf jeder Platte die jeweils gleichbleibende Auftragslinie bzw. die Auftragspunkte aufzeichnen zu müssen, wurde mit einer Unterlegschaablone gearbeitet.

3.3 Versuche und Ergebnisse

3.3.1 Versuche mit der Methode von SCHMIDHOFER und EGLI (1973, 1974)

3.3.1.1 Grundversuche

Erste Versuche wurden mit der Methodik von SCHMIDHOFER und EGLI durchgeführt, wobei die Platten mit Bahneinteilung und das Laufmedium Agarose zur Anwendung kamen (Tab. 1).

Die Temperatur des Kühlmediums betrug bei beiden Methoden (Tab. 1) am Geräteausgang -1°C . Für orientierende Versuche wurde nach ROTH (1971) Penicillin G in der Konzentration von 1 I.E./ml Rohmilch im Zylindertest, Auftragsvolumen 20 μl , gewählt. ROTH benutzte Penicillin als Laufstreckenbezugssubstanz. Der Nachweis bei den eigenen Untersuchungen erfolgte nach der Methode von SCHMIDHOFER und EGLI (1973, 1974) mit Überschichtung von Antibiotic Medium 1 (DIFCO), pH 6,6, in einer Schichtdicke von 1,5 mm. Als Testkeim diente *Sarc. lutea* mit einer Einsaat von 10^4 Keimen/ml bei einer Bebrütungstemperatur von 34°C für 16 Stunden.

Da die Temperatur der Kühlsole (Meßpunkt Geräteausgang) nicht mit den wahren Temperaturverhältnissen auf der Oberseite der Arbeitsfläche übereinstimmte, begann das Laufmedium nach 35 Minuten Laufzeit zu vereisen und die Stromstärke ging nach 60 Minuten auf 2 mA zurück.

Auf Grund der Vereisung der Agarose war die Platte nicht verwertbar.

Kühltemperatur

Bei späteren Versuchen wurde die Thermometeranzeige nach Angabe des Herstellers der auf der Arbeitsfläche gemessenen Temperatur angeglichen. Unberücksichtigt blieb weiterhin der Temperaturverlust, der trotz Wasserunterfütterung zwischen dem Kühltisch und den Grundplatten der Trennplatten auftrat. Bei weiteren Versuchen mit den in Bahnen unterteilten Platten wurde mit einer Kühltemperatur auf der Oberseite der Arbeitsfläche von 3° C gearbeitet. Vereisungen des Laufmediums traten nicht mehr auf.

Spannung und Wanderungsgeschwindigkeit

Weiterhin wurden gegenüber dem Grundversuch Spannung, Trennzeit, Schichtdicke und Konzentration der Agarose sowie die Menge und Molarität des der Agarose zugesetzten Puffers verändert. Änderungen sind jeweils gesondert angegeben.

Die Spannung erwies sich als wesentlicher Faktor für die Wanderungsgeschwindigkeit des Penicillins. Im Versuch wurde 1 %ige Agarose mit 10 % 1/15 molarem Phosphatpuffer pH 5,5 verwendet. Die Laufzeit betrug 120 Minuten bei 3° C. Als Testkeim wurde *Sarc. lutea* (10^4 Keime/ml) auf Antibiotic Medium 1 (DIFCO) pH 6,6 in der Schichtdicke von 1,5 mm benutzt. Als Testsystem wurde der Zylindertest (20 µl Auftrags-

volumen) gewählt. Das eingesetzte Penicillin G (1 I.E. pro ml Magermilch) ergab einen durchschnittlichen Hemmzonenlängsdurchmesser von 35,3 mm. Die Zunahme der f-Scheitelpunktwerte verhielt sich proportional zu der angelegten Spannung, und zwar 49 mm : 1000 V; 76 mm : 1500 V und 106 mm : 2000 V.

3.3.1.2 Verteilungsmuster einiger Antibiotika bei saurer Auftrennung mit dem Laufmedium Agarose

Es wurden nun die Verteilungsmuster einiger Antibiotika bei saurer Auftrennung in einem gegenüber dem Grundversuch in Spannung, Laufzeit und Kühltemperatur geänderten Verfahren untersucht (Tab. 2 und 3). Die f-Scheitelpunkt- bzw. f-Mittelpunktangaben sind absolute Werte. Einige Substanzen wurden mit einem nicht optimal empfindlichen Testkeim geprüft, z.B. Penicilline mit *B. subtilis* (pH 8,0) anstelle von *Sarc. lutea* (pH 6,6), um bei den hohen Konzentrationen zu große Hemmzonen zu vermeiden.

Versuchsbedingungen zu den Tabellen 2 und 3:

1 % Agarose mit 10 % 1/15 molarem Phosphatpuffer pH 5,5 / Schichtdicke 1,3 mm / 2000 V / 120 Min / 3⁰ C. Konzentrationsangaben pro ml Vollmilch / 20 µl im Lochtest. *B. subtilis* (10⁴ Sporen/ml Testagar, pH 8,0), *B. cereus* (10⁴ Sporen/ml Antibiotic Medium 1, pH 6,6) und *Sarc. lutea* (10⁴ Keime/ml Antibiotic Medium 1, pH 6,6). Die Schichtdicke betrug 1,4 mm.

Im Hinblick auf die unterteilenden Silikonkautschukstreifen wies Streptomycin-Sulfat eine Besonderheit auf, die die genaue Bestimmung der f-Scheitelpunktwerte erschwerte. Es

wurde daraufhin nicht mehr in die weiteren Untersuchungen einbezogen. Im Gegensatz zu anderen Testsubstanzen wie den Penicillinen, Tetracyclinen, dem Neomycin und auch dem Chloramphenicol bildeten Streptomycin und in geringem Ausmaß Rifamycin keine geradlinigen Fronten der Hemmzonen aus, sondern zeigten eine starke Affinität zu den Silikonkautschukstreifen. Dies äußerte sich je nach Konzentration in der in Abb. 1 wiedergegebenen Weise.

Eine Standardabweichung für Streptomycin bestätigte außerdem die Vermutung, daß die beiden verwendeten Trennplatten nicht die gleiche Reproduzierbarkeit erbrachten. Innerhalb der Platten trat zudem eine nicht unerhebliche Streuung der f-Scheitelpunktwerte auf. Dies, sowie auch zum Teil das "Anhängen" des Streptomycin an den Silikonkautschukstreifen, wurde auf die bei einer berechneten Schichtdicke von 1,4 mm ungleichmäßige Beschichtung der Platten zurückgeführt. Auf Grund seiner Viskosität zeigte das Laufmedium in den 13 mm breiten Laufgräben eine deutlich erkennbare Konusbildung, die eine Verlagerung der Hemmstoffkonzentration zu den Grabenrändern begünstigte.

Aus mehreren Vergleichsuntersuchungen ging hervor, daß sich eine der Platten beim Aufkleben der Randstreifen bzw. Silikonkautschukstreifen verzogen hatte und nicht plan war.

3.3.1.3 Gelartefakte bei Platten mit Bahneinteilung "Wannenbildung" am Auftragungsort

Bereits kurz nach Einschalten der Hochspannung trat um die Zylinder am Auftragungsort eine "Wannenbildung" auf, die in Richtung auf die Katode fortschritt. Die "Wannen" bildeten

sich um die mit Milch oder Harn gefüllten Zylinder. Bei leeren Glaszylindern blieb die "Wannenbildung" aus. Auch bei Anwendung des Loch- und Blättchentestes trat diese "Wannenbildung" auf, war jedoch im Falle der Testblättchen nicht so stark ausgeprägt. Die "Wannen" nahmen im Verlauf der Elektrophorese teilweise so starke Ausmaße an, daß das Gel an den angrenzenden Silikonkautschukstreifen nur noch wenige mm breite Gelbrücken bildete. Die Länge der "Wannen" betrug bis zu 130 mm. Das Ausmaß der "Wannenbildung" stand in Abhängigkeit zur Art der aufgetragenen Probe. Bei Harn waren die "Wannen" stärker ausgeprägt als bei Milch. Voll- oder Magermilch zeigten keine nennenswerten Unterschiede.

"Wannenbildung" auf der Katodenseite der Trennplatte

Ebenso erschienen im Verlauf der Elektrophorese auf der Katodenseite der Trennplatten flache "Wannen" im Gel, die sich allmählich anodenwärts ausbreiteten. Sie hatten ihren Ursprung an und unter den aufgelegten Stromübertragungstreifen und erstreckten sich über die gesamte Plattenbreite. Auch diese "Wannen" erreichten Längenausdehnungen bis zu 130 mm.

In den "Wannen" konnte die Gelschicht teilweise bis zu 1 mm an Schichtdicke abnehmen. Die Folge waren ungleichmäßige Schichtdicken des Laufmediums und des Nachweismediums, Änderungen der Hemmstoffkonzentrationsflächen sowie der Diffusionsbedingungen.

Elektroosmose

Auf der Katodenseite der Platten sammelten sich mitunter erhebliche Mengen an Wasser. Das Laufmedium wirkte an diesen Stellen weniger fest, während auf der Anodenseite die Aga-

rose austrocknete. Als Folge riß das Gel von den anodenseitigen Plattenrändern ab. Gelegentlich traten Längseinrisse des Gels auf. Quereinrisse führten zu Lichtbogenbildung bzw. Unterbrechung des Stromflusses.

Ansammlung von Wasser in den Probenauftrags- zylindern und -löchern

Schon wenige Minuten nach Einschalten der Spannung, gleichzeitig mit Beginn der "Wannenbildung", bildeten sich auf der Geloberfläche Wassertropfen und in den Auftragslöchern und -zylindern nahm die Flüssigkeitsmenge zu. Es bildeten sich während der Elektrophorese konfluierende Schlieren, die das Gel in der gleichen Weise wie bei der "Wannenbildung" veränderten. Die erwähnten Flüssigkeitsansammlungen mußten nach beendetem Lauf mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden. Um eine Verunreinigung mit Schmutzkeimen zu verhindern, wurde der Saugstutzen der Pumpe abgeflammt.

3.3.2 Trennplatten ohne Bahneinteilung

Bei diesen Versuchen sollte geprüft werden, ob die Antibiotika auch über längere Wanderungsstrecken geradlinig wanderten oder entsprechend den Feldlinien des elektrischen Feldes eine gebogene Bahn erhielten.

Die weiteren Versuche dienten der Reduzierung störender Artefakte bei gleichzeitiger Erhöhung der f -Werte. Es wurde zusätzlich darauf geachtet, daß die Hemmzonen der verschiedenen Antibiotika möglichst gleichmäßig über die Plattenlänge verteilt waren.

3.3.2.1 Verteilungsmuster einiger Antibiotika in Abhängigkeit von Laufmedium und pH-Wert

Laufmedium Agarose

Fünf Antibiotika wurden in niedrigem pH-Bereich geprüft (Abb. 2 und 3). Rifamycin und Chloramphenicol hatten bei pH 4,5 nahezu gleiche f -Werte und waren, da sie mit dem gleichen Testkeim nachgewiesen wurden, auch nicht auf Grund ihrer Testkeimempfindlichkeit zu trennen. Neomycin wanderte bei pH 5,5 in geringem Maße zur Katode.

Eine deutliche Änderung der Laufrichtung erfuhren Neomycin und Rifamycin im neutralen bis schwach alkalischen pH-Bereich (Abb. 4 und 5). Die räumliche Trennung der einzelnen Hemmzonen ist bei Pufferung mit pH 7,5 deutlich stärker ausgeprägt.

Laufmedium Agar Noble

Saurer pH-Bereich

Penicilline und Neomycin wanderten bei Pufferung des Agar Noble auf pH 5,5 zur Anode, während Rifamycin, Dihydrostreptomycin, Chloramphenicol, die Tetracycline und Erythromycin katodenwärts wanderten (Abb. 6).

Alkalischer pH-Bereich

Grundsätzlich war die Wanderungsrichtung bei pH 7,5 und 8,0 die gleiche wie bei pH 5,5. Lediglich Rifamycin war im alkalischen Bereich nicht so weit nach der Katodenseite hin verschoben. Auch waren bei pH 8,0 die Hemmzonen gleichmäßiger gestreut (Abb. 7 und 8).

Sowohl bei Agarose als auch bei Agar Noble konnte eine Abweichung der Antibiotika von ihrer geradlinigen Wanderung, selbst bei f-Werten von mehr als 200 mm, nicht festgestellt werden. Eine Erhöhung der f-Werte auf den Außenbahnen der Trennplatten infolge geringerer Kühlwirkung konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

3.3.2.2 Beeinflussung der Wanderungstrecken

Spannungseinfluß

Das bereits für Penicillin auf Agarose (pH 5,5) über die Spannung Ausgesagte gilt sinngemäß auch für das Laufmedium Agar Noble. Allerdings konnte nicht für sämtliche geprüften Antibiotika durch entsprechende Spannungserhöhung ein Streckenzuwachs im gleichen Verhältnis erzielt werden (Tab. 4).

Allgemein hatte die Erhöhung der Spannung außerhalb des I.P. eine größere Wanderungsgeschwindigkeit zur Folge. Substanzen, deren I.P. in der Nähe des vom Laufmedium vorgegebenen pH-Wertes lagen, blieben auf Grund geringerer Dissoziation hinter den erwarteten f-Werten zurück.

Temperatureinfluß

Tab. 5 gibt das Verhalten von acht Substanzen (incl. Bromphenolblau) bei einer Erhöhung der Kühltemperatur um 7° C wieder. Die von der Firma CAMAG gemachte Feststellung (SCHMIDHOFER und EGLI, 1973, 1974), daß eine Temperaturerhöhung um 1° C einen Laufstreckenzuwachs von 3 % erbringt, ist nicht zu verallgemeinern, da bei verschiedenen Substan-

zen bei gleichem pH-Wert und gleicher Temperatur ein unterschiedlicher Dissoziationsgrad vorliegt. Der Prozentsatz der Steigerung pro 1°C Temperaturerhöhung schwankte zwischen 1,1 und 12,0 %. Das Ausbleiben einer Wanderungssteigerung bei Neomycin lag im Bereich der üblichen Meßungenauigkeit.

Generell hatte jedoch eine Temperaturerhöhung eine größere Wanderungsgeschwindigkeit zur Folge.

Einfluß der Viskosität

Weiterhin wurde der Einfluß der Viskosität am Beispiel des Laufmediums Agarose untersucht (Tab. 6). Auch in diesem Fall läßt sich auf Grund unterschiedlicher Dissoziation keine verallgemeinernde Schlußfolgerung ziehen. Aus den Werten von Rifamycin, Oxytetracyclin und Chloramphenicol läßt sich jedoch entnehmen, daß die geringere Gelkonzentration auf Grund des geringeren mechanischen Widerstandes auch größere f -Werte zur Folge hatte. Deutlich trat mit steigender Viskosität die Abnahme von Artefakten wie Schlierenbildung, Entstehung von "Wannen" im Gel auf der Katodenseite und Einrisse des Gels hervor. Die Verwendung von Gelen in höherer Konzentration als 3 % ist jedoch wegen des zu raschen Erstarrens während der Beschichtung der Trennplatten nicht empfehlenswert.

Einfluß der Elektrolytkonzentration des Trenngels (Pufferzusatz)

Der Einfluß des Pufferzusatzes auf die f -Werte ist am Beispiel eines 1/30 molaren Phosphatpuffers (pH 7,5) untersucht worden (Tab. 7).

Aus der Tab. 7 geht hervor, daß nicht alle Substanzen im Hinblick auf ihre f -Werte bei unterschiedlichem Pufferzusatz

gleich reagieren. Für Oxytetracyclin und Erythromycin scheint die Beziehung gegeben zu sein, daß mit steigendem Pufferzusatz die f-Werte abnehmen. Für Rifamycin, Neomycin und Chloramphenicol erbrachte ein Pufferzusatz von 50 Vol.% die höchsten f-Werte; 100 % die niedrigsten. Insgesamt entstand der Eindruck, daß mit steigendem Elektrolytgehalt die f-Werte abnehmen. Eine Erklärung für die unterschiedliche Dissoziation und somit unerwartete f-Streckenänderung einzelner Substanzen konnte nicht gefunden werden.

Eine gleichmäßige Tendenz ist jedoch in der Abnahme der Artefakte zu erkennen (Tab. 7). Weiterhin ergab 100 % Phosphatpufferzusatz (1/30 molar, pH 7,5) allgemein weitgehend runde Hemmzonen, wohingegen 10 % Pufferzusatz bei Erythromycin und Oxytetracyclin zur Schwanzbildung (tailing) führte.

pH-Wert des Trenngels

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von RIEVE et al. (1974) sowie SCHMIDHOFER und EGLI (1974) wurde die Feststellung gemacht, daß die drei Testkeime entlang des Plattenrandes, insbesondere aber auf der Katodenseite der Trennplatten, Wachstumsstörungen aufwiesen. Am stärksten zeigte sich *B. cereus* (pH 6,6) davon betroffen, dann *Sarc. lutea* (pH 6,6) und schließlich *B. subtilis* (pH 8,0). Auch flossen nahe beieinanderliegende Hemmzonen vielfach zu konfluierenden, unregelmäßigen Hemmflächen zusammen. Diese Erscheinung war umso stärker ausgeprägt, je größer der Elektrolytgehalt der Probe war. Das zeigte sich besonders bei Einsatz von eingedickter Milch, von Harn- und von Nierenmarkproben. Aber auch ein zu hoher Elektrolytgehalt des Laufmediums, wie 1/15 molarer Phosphatpuffer gegenüber 1/150 molarem bzw. 100 Vol.% Pufferzusatz

eines Puffers gegenüber 10 Vol.%, konnte bei Untersuchungen von Milchproben zu diesen Erscheinungen führen.

Schichtdicke

Der Einfluß der Schichtdicke des Laufmediums wirkte sich hauptsächlich zusammen mit der Viskosität auf die Größe der Hemmzonen und ihre Randschärfe und weniger auf die f -Werte aus. Je größer die Schichtdicke von Laufmedium und Nachweismedium waren und je visköser das Laufmedium war, desto kleiner und schärfer fielen die Hemmzonen aus.

Trennungsdauer

Eine Trennzeit von 120 Minuten reichte erfahrungsgemäß aus, um die f -Strecken von ähnlich laufenden Substanzen genügend weit auseinanderzuziehen. Unter Standardbedingungen hatte der Farbindikator Bromphenolblau meist das anodenseitige Ende der Trennplatte erreicht.

3.3.2.3 Farbindikatoren

Erst durch den Einsatz von Farbindikatoren bei der Elektrophorese wurde festgestellt, daß während der Trennung mitunter erhebliche Änderungen des pH-Wertes im Laufmedium auftraten.

So wurde mit Hilfe von Bromphenolblau (0,05 %ig) und Bromthymolblau (1,0 %ig) unter Verwendung von Agar Noble mit 10 % 1/150 molarem Phosphatpuffer (pH 5,5) in zwei Fällen ein Absinken des pH-Wertes unter pH 4,6 und in einem Fall ein Ansteigen über pH 6,0 festgestellt. Bei Pufferung mit 1/150 molarem Phosphatpuffer (pH 8,0) wurden diese pH-Änderungen nicht be-

obachtet. Von diesen pH-Wert-Änderungen wurde jedoch nicht gleichmäßig die gesamte Platte betroffen, sondern die Anodenseite mehr als die Katodenseite. Im Falle der Anhebung des pH-Wertes hatte die Zone der pH-Änderung eine Breite von ca. 10 cm. Aus dieser Beobachtung geht hervor, daß unter den beschriebenen Pufferbedingungen die Pufferkapazität nicht ausreichte, um den pH-Wert des Trenngels konstant zu halten. Die Beobachtung bietet zudem die Erklärung für die Wachstumsstörungen der Testkeime.

In Tab. 8 wird auf immer wieder beobachtete unterschiedliche f-Werte bei Bromphenolblau hingewiesen. Obwohl die Platten mit derselben Gelcharge hergestellt und gleichzeitig der Trennung unterzogen wurden, variierten die Wanderungsstrecken der Farbflecken sowohl bei Trennungen im alkalischen wie im sauren pH-Bereich erheblich. Ob eine ungleichmäßige Kühlung der einzelnen Platten dafür verantwortlich war, konnte nicht geklärt werden. Es wird jedoch angenommen, daß für diese Erscheinung ebenfalls die sich während der Trennung verändernden Pufferbedingungen im Trennmedium als Ursache dafür anzusehen sind.

3.3.2.4 Stromstärke

Die von ROTH (1974) geäußerte Erfahrung, daß die Stromstärke einen Wert von 50 mA nicht übersteigen sollte, erwies sich auch für die eigenen Versuche als richtig. Spannungen über 2500 V führten bei gleichzeitig hohem Elektrolytgehalt von Laufmedium oder Probe zu unerwünschten Störungen wie raschem Anstieg der Stromstärke sowie vermehrter Wärmebildung im Elektrodenpuffer und Laufmedium mit Evaporation der Pufferflüssigkeit.

3.3.2.5 Artefakte

Das bisher über Gelartefakte Gesagte gilt sinngemäß auch für Platten ohne Bahneinteilung. Grundsätzlich traten sowohl bei Agarose als auch bei Agar Noble und bei den beimpften Nährböden die gleichen Veränderungen am Trenngel auf.

Eine Elektrolytanreicherung im Trenngel, sei es durch zu starke Pufferung oder zu elektrolythaltige Proben wie Harn, Muskulatur oder Nierenmark führte zu Erhöhung des Stromflusses, erhöhter Wärmebildung mit Evaporation der Pufferflüssigkeit, Elektrosmose, Geleintrissen und "Wannenbildung" im Laufmedium.

3.3.2.6 Verhalten von Standard-Einzelproben zu -Mischproben

Die bereits beschriebene pH- und Elektrolytmengen-Abhängigkeit der f-Werte der untersuchten Substanzen kann sich in der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von Standard-Einzelproben und Standard-Mischproben ausdrücken. Als Beispiel für diese Abweichung der f-Werte seien Neomycin, Rifamycin und Oxytetracyclin genannt (Tab. 9). Bei den f-Scheitelpunktwerten ergab sich eine Differenz von jeweils 3 mm (OTC, Rifamycin), bei den "f-Konzentrationsschwerpunkten" eine Differenz von 3 mm (OTC, Rifamycin) und 1 mm (Neomycin), die von der unterschiedlichen Pufferung bzw. dem unterschiedlichen Elektrolytgehalt bei gleicher Matrix herrührte.

3.3.2.7 f-Werte

f-Scheitelpunkt

Unter dem Scheitelpunkt ist der Punkt einer Hemmfläche zu verstehen, der am weitesten in Richtung auf eine der beiden Elektroden vom Auftragungsort entfernt liegt. Die absolute Wanderungsstrecke wurde als f-Scheitelpunkt bezeichnet.

Es wurden Beispiele von Konzentrationsstandardreihen von vier Antibiotika auf dem Laufmedium Agar Noble mit 10 % 1/150 molarem Phosphatpuffer (pH 5,5 und 8,0) dargestellt (Abb. 9, 10, 11 und 12, Tab. 10 und 11).

Die Abhängigkeit der f-Scheitelpunktwerte von der Konzentration des Antibiotikums geht aus den Tab. 10 und 11 sowie den Abb. 9, 10, 11 und 12 deutlich hervor. Sie war bei Rifamycin und pH 5,5 am deutlichsten ausgeprägt, gefolgt von Oxytetracyclin und Erythromycin (Tab. 10). Ein ähnliches Bild ergab sich für den alkalischen Bereich (Tab. 11).

"f-Konzentrationsschwerpunkt"

Die Hemmflächen der geprüften Antibiotika wiesen in der Pegel charakteristische Formen auf. Im allgemeinen waren es ovoide Flächen, deren spitzes Ende infolge der Schwanzbildung (tailing) in Richtung des Auftragsortes zeigte. Chloramphenicol erschien regelmäßig als runde Zone, die Penicilline sehr häufig. Bei Neomycin zeigte sich der stumpfe Pol der ovoiden Fläche abgeflacht. In allen Fällen wurde jedoch bei genügend kleiner Hemmzone (ca. 10 - 20 mm Längendurchmesser) in bezug auf die Laufrichtung eine bauchige Form erkennbar. Es ist die Stelle der höchsten Konzentration des gewanderten Antibiotikums. Auf Grund der radiären Diffusion gelöster Stoff-

fe in gelartigen Medien bleibt die flächenmäßige Verteilung der gewanderten Substanz nach Beendigung der Trennung erhalten. Sie wird durch die Übersichtung mit dem Nachweismedium während der Bebrütungsdauer lediglich größer. Der Ort dieser höchsten Konzentration eines gewanderten Hemmstoffes wird ermittelt, wenn die parallel zur Laufrichtung genommenen Tangentialpunkte der breitesten Stelle der Hemmfläche miteinander verbunden werden. Der Schnittpunkt dieser Sekante mit der Längsmittelachse der Hemmzone bildet den Konzentrationsschwerpunkt der gewanderten Substanz (Abb. 13).

Aus Abb. 11 und 12 geht hervor, daß sowohl alle f-Scheitelpunkte als auch alle "f-Konzentrationsschwerpunkte" einer Standardverdünnungsreihe einer Regressionsgeraden zuzuordnen sind. Die Auftragslinie entspricht jeweils der Ordinatenebene. Es fällt auf, daß bei nahezu allen untersuchten Substanzen mit steigender Konzentration auch die f-Werte zunehmen (Tab. 10 und 11). Eine Ausnahme stellt Erythromycin dar (und möglicherweise Oxytetracyclin), bei dessen Konzentrationsschwerpunkten die umgekehrte Beziehung gegeben zu sein scheint. Bei Neomycin und Rifamycin sind bei pH 8,0 alle Konzentrationsschwerpunkte gleich schnell gewandert, während sich bei allen übrigen Situationen die Konzentrationsabhängigkeit der f-Werte mehr oder minder deutlich macht. Insgesamt ist die Konzentrationsabhängigkeit der "f-Konzentrationsschwerpunkte" mit Ausnahme bei Erythromycin (pH 5,5) schwächer ausgebildet als bei den f-Scheitelpunkten. Sie tritt weiterhin bei pH 8,0 nicht so deutlich in Erscheinung wie bei pH 5,5 (Tab. 10 und 11). Erwähnt werden sollte noch der Einfluß des pH-Wertes des Trenngels auf die Nachweisempfindlichkeit der Testkeime. Neomycin und Erythromycin lassen

sich bei pH 8,0 besser nachweisen als bei pH 5,5, wohingegen Oxytetracyclin bei pH 5,5 leichter erfaßt wird (Abb. 11 und 12).

3.3.3 Standardmethodik

Nach zahlreichen Versuchen zur elektrophoretischen Trennung von Antibiotika in der Milch kann folgende Methodik für das HÖLZEL-Gerät empfohlen werden:

Als Laufmedium ist 2,5 % Agar Nobel (DIFCO) mit 10 Vol.% 1/150 molarem Phosphatpuffer (pH 8,0) bei einer Schichtdicke von 1,5 mm zu verwenden. Geringfügige Abweichungen des pH-Endwertes des Trennmediums von $\pm 0,1$ können zur Vermeidung zu hoher Elektrolytkonzentrationen des Laufmediums durch die pH-Korrektur toleriert werden.

Die Trennung ist mit 2500 V für 120 Minuten und einer Kühltemperatur des Kühltesches von 10° C durchzuführen. Ein Vorlauf bei 500 V für fünf Minuten ist nicht erforderlich.

Bei Verwendung von drei Trennplatten sollte sich die Stromstärke im allgemeinen zwischen 40 und 50 mA bewegen, wenn der pH-Wert des Laufmediums nicht oder nur unwesentlich korrigiert werden mußte.

Die Auftragung der Proben erfolgt mit Hilfe von Blättchen (SCHLEICHER u. SCHÜLL, Ø 12,7 mm) bei einer Vordiffusionszeit von 60 Minuten bei Zimmertemperatur. Anschließend sind die Blättchen zu entfernen. Durch das Entfernen der Träger während der Trennung kann die "Wannenbildung" am Auftragungs-ort nahezu vollständig vermieden werden.

Um pH-Änderungen während der Trennung erkennen zu können, sind in der Auftragslinie Farbindikatoren (Bromphenolblau, Bromthymolblau) aufzutropfen, die es gestatten, die pH-Änderung nach dem Lauf grob abzuschätzen. Durch entsprechendes Einstellen des Nachweismediums mit NaOH oder HCl kann der für den Nachweis gewünschte pH-Wert wieder hergestellt (kenntlich durch erneuten Farbumschlag nach dem Überschichten mit dem Nachweismedium) und eine allgemeine Unterdrückung des Keimwachstums vermieden werden.

Die Überschichtung der Platten mit Antibiotikanachweismedien erfolgt für *Sarc. lutea* und *B. cereus* mit Antibiotic Medium 1 (DIFCO), pH 6,6 und für *B. subtilis* mit Testagar (MERCK), pH 8,0. Die Schichtdicke sollte 1,5 mm betragen. Nach Abkühlung bei Zimmertemperatur werden die Platten für 16 Stunden bei 34° C bebrütet.

Zur Auswertung sind die "f-Konzentrationsschwerpunkte" heranzuziehen.

Substanzen, deren Hemmzonen in der Nähe ähnlich gewanderter Testsubstanzen liegen und die auch auf Grund anderer Merkmale nicht eindeutig identifiziert werden können, sollten einer zweiten elektrophoretischen Trennung im sauren pH-Bereich unterzogen werden. In der Regel gelingt damit eine deutliche Differenzierung.

4. Bespprechung der Ergebnisse

Eine deutliche Trennung niedermolekularer Substanzen wie der meisten Antibiotika innerhalb kurzer Zeit ist mit Hilfe der Elektrophoresetechnik nur bei Erzielung hoher elektrischer Feldstärken möglich. Diese lassen sich entweder durch sehr kurze f-Strecken, wie bei der von LANGNER et al. (1973a, c) beschriebenen Methode im sogenannten "Ultra-Mikro-Maßstab", erreichen oder in größeren Dimensionen mit der Hochspannungselektrophorese. Die bei der dazu notwendigen Anwendung hoher Spannungen auftretende Erwärmung des gepufferten Trennmediums erfordert eine entsprechende Kühltechnik. Als in der Handhabung vollkommen unproblematisch erwies sich die verwendete Elektrophorese-Apparatur mit eingebauter Kontaktkühlung. Das ständige Auswechseln häufig leicht entzündlicher Kühlmittel entfiel hiermit.

Die von verschiedenen Autoren genannten Werte für die Kühltemperatur beziehen sich in der Regel auf die Temperatur der Kühlflüssigkeit (LANGNER et al. 1973c; LIGHTBOWN und de ROSSI, 1965; RIEVE et al., 1974; ROTH, 1971; SCHMIDHOFER und EGLI, 1973, 1974) und nur selten auf die Temperatur im Trennmedium (LANGNER et al., 1973a). Dadurch wird ein Vergleich der Methoden erschwert. Der Temperaturverlust zwischen dem Kühlmittel und dem Trennmedium erwies sich bei dem verwendeten Gerät als derartig niedrig, daß Temperaturen der Kühlsole bis 2° C zu Vereisung des Laufmediums führten. Die Temperaturanzeige des Gerätes wurde daher mit der auf der Oberfläche des Kühltisches gemessenen Temperatur abgeglichen und die Kühltemperatur zur Trennung auf 10° C erhöht. Der aus der

Temperaturerhöhung resultierende Anstieg der Wanderungsgeschwindigkeit konnte zur besseren Trennung der untersuchten Substanzen genutzt werden. Die von SCHMIDHOFER und EGLI (1973, 1974) erwähnte Feststellung der Firma CAMAG, daß Temperaturerhöhung um 1°C einen Zuwachs der f-Strecken von 3 % erbringt, ist nicht zu verallgemeinern. Entsprechend der pH- und temperaturabhängigen Dissoziation kommt es bei verschiedenen Hemmstoffen zu einem unterschiedlichen Anstieg der Wanderungsgeschwindigkeit. Die Erhöhung der Spannung und der Trenndauer verhält sich jedoch proportional zur Verlängerung der Wanderungsstrecken.

Die von SCHMIDHOFER und EGLI (1974) verwendeten Trennplatten mit Bahneinteilung zur besseren Unterscheidung nebeneinanderliegender Hemmzonen bringen gegenüber Platten ohne Bahneinteilung gewisse Nachteile mit sich. Es können zwar mehr Proben pro Platte aufgetragen und mehrere Testkeime nebeneinander eingesetzt werden, die Erzielung gleichmäßiger Schichtdicken des Laufmediums erweist sich jedoch als äußerst problematisch. Sie wird erschwert durch Konusbildung des Trenngels in zu engen Bahnen sowie durch die großen Plattenlängen bei modernen Hochspannungs-Elektrophorese-Apparaturen. Ferner ist, wie im Falle von Streptomycin und Rifamycin, auf die Verwendung des Plattenmaterials besonderer Wert zu legen. Einige Substanzen scheinen zu Silikonkautschuk eine Affinität zu besitzen, was zu unerwünschter Hemmzonenbildung führt und die Ermittlung der Laufstrecken erschwert oder sogar unmöglich macht. Die Herstellung schmaler Trennstreifen aus Glas ist jedoch wesentlich schwieriger als die Auftragung von Silikonkautschukstreifen.

Weiterhin wird der Vorteil der seitlich eingeschränkten Diffusion des Antibiotikums bei hohen Konzentrationen durch entsprechende Längenausdehnung der Hemmzone aufgehoben. Eine hohe Konzentration eines Antibiotikums führt zu einer, die ganze Bahnbreite ausfüllenden, langgestreckten Hemmfläche. Die Hemmfläche einer ähnlich gewanderten Substanz wird damit ganz oder zumindest teilweise überdeckt, und ihr Scheitelpunkt kann nicht erkannt werden. Es besteht die Gefahr, daß bei Verringerung der Hemmzonengröße durch Verdünnung der Probe ein zweites Antibiotikum mit einer niedrigeren Konzentration vom entsprechenden Testkeim nicht mehr erfaßt wird. Das Ergebnis würde somit statt einer Antibiotikakombination nur eine einzige antibiotisch wirksame Komponente vortäuschen. Der grundlegende Nachteil der Bahneinteilung besteht demnach darin, daß ein Hemmstoff nur an dem Scheitelpunkt bestimmt werden kann.

Bei Platten ohne Bahneinteilung ist zwar die Beschichtung problemlos, es können jedoch pro Platte wesentlich weniger Proben eingesetzt werden, da benachbart liegende Hemmstoffe mit ihren Hemmflächen ineinander übergehen können. Der Einsatz von drei Testkeimen wurde durch die Verwendung von gleichzeitig drei Trennplatten möglich. Der Vorteil einer zusätzlichen Differenzierungsmöglichkeit auf Grund der Testkeim-Empfindlichkeit, wie bei der Methode von SCHMIDHOFER und EGLI (1973, 1974), blieb somit erhalten. Grundsätzlich besteht jedoch bei Platten ohne Bahneinteilung ebenso das Problem, daß bei dicht hintereinanderliegenden Hemmzonen infolge zu hoher Konzentration und "Schleppenbildung" eines Antibiotikums der Hemmhof eines anderen Hemmstoffes überdeckt wird. In praxi lassen sich jedoch die Hemmzonen verschiedener

Antibiotika bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer Testkeime infolge unterschiedlicher Testkeimpfindlichkeit unterscheiden.

Die meisten Hemmstoffe bilden bei Konzentrationen, die für die Gel-Elektrophorese einen idealen Hemmzonenlängsdurchmesser von 10 - 20 mm hervorrufen (GRYNNE, 1973; LANGNER et al., 1973a; ROTH, 1971), runde, elliptische oder ovoide Hemmflächen (Flächen mit "Bauch") und erleichtern damit ihre Lokalisation. Dicht hintereinanderliegende Hemmstoffe können anhand ihrer "Bäuche" erkannt werden (LIGHTBOWN und de ROSSI, 1965; ROTH, 1971). Eine Platte mit Bahneinteilung weist in diesem Fall nur eine verlängerte Hemmbahn auf.

Antibiotika, deren Differenzierung bei gleichartiger Wanderung und Detektion mit dem gleichen Testsystem im sauren pH-Bereich Schwierigkeiten bereitet, lassen sich im alkalischen pH-Bereich mühelos trennen. Diese Erfahrung wurde sowohl mit dem Laufmedium Agarose wie Agar Noble gemacht. Für beide Laufmedien kann gesagt werden, daß die Auftrennung im alkalischen pH-Bereich bei den untersuchten Antibiotika zu einer gleichmäßigen Verteilung über die zur Verfügung stehende Trennplattenfläche führte.

Der Hinweis verschiedener Autoren (GRYNNE, 1973; LANGNER et al., 1973a; LIGHTBOWN und de ROSSI, 1965), daß einige der im Handel erhältlichen Antibiotikareinsubstanzen mehrere Komponenten enthalten, konnte bestätigt werden. Wegen Fehlens der entsprechenden Einzel-Testsubstanzen wurde jedoch nicht näher untersucht, um welche der aufgetrennten Komponenten es sich im jeweiligen Falle handelte. Die von LIGHTBOWN und de ROSSI (1965) gezeigte Auftrennung von Rifamycin- und Neomy-

cingemischen ist vermutlich vom pH-Wert und der Elektrolytkonzentration der Probe und des Trennmediums abhängig. Die Auftrennung einer Testsubstanz in mehrere biologisch aktive Komponenten wurde nicht unter allen Versuchsbedingungen festgestellt.

Zu der bisher in der Literatur üblichen Angabe der f-Scheitel- und -Mittelpunktwerte (bei runden Hemmzonen) von in der Elektrophorese gewanderten Antibiotika wird besonders für Hemmzonen von elliptischer oder ovoider Gestalt die Ermittlung des "f-Konzentrationsschwerpunktes" empfohlen. Er gewährleistet in vielen Fällen einer Hemmzonenüberlagerung auf Grund der "Bauchbildung" der gewanderten Antibiotika eine leichtere Bestimmung der gesuchten Substanzen als die bisher üblichen f-Werte. Grundsätzlich ist eine Differenzierung nach beiden f-Werten möglich. Im Falle einer Hemmzonenüberlagerung muß jedoch auf die Bestimmung der f-Scheitelpunkte dicht beieinanderliegender Hemmstoffe im gleichen Testsystem verzichtet werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sowohl die Wanderungstrecke der Scheitelpunkte als auch der "Konzentrations-schwerpunkte" einer Abhängigkeit von der Konzentration des Antibiotikums unterliegen. Sie ist in der Regel bei den f-Scheitelpunkten stärker ausgeprägt als bei den "f-Konzentrationsschwerpunkten". Die Erklärung hierfür ist in der stärkeren radiären Diffusion höherer Konzentrationen in einem gelartigen Medium zu sehen, wie sie von spezifischen mikrobiologischen Quantitätsbestimmungen für Antibiotika bekannt ist. Es sollten deshalb die Hemmflächen von Vergleichs- und Untersuchungsproben im Elektropherogramm annähernd gleich groß ausfallen. Das bedeutet jedoch, daß der elektrophore-

tischen Antibiotikadifferenzierung ein Allgemeiner Hemmstofftest mit den entsprechenden Testkeimen vorausgeht, der es gestattet, die Probe auf die für das Elektropherogramm gewünschte Hemmzonengröße zu verdünnen oder einzudicken. Dies ist zumindest bei der Auswertung nach den f-Scheitelpunkten erforderlich.

Aus vielen Versuchen ergaben sich Hinweise auf die von LANGNER et al. (1973a) geäußerte Zonenimperfektion bzw. auf die Schwierigkeiten einer Standardisierung der Gel-Elektrophorese. Die bereits von anderen Autoren (RIEVE et al., 1974; SCHMIDHOFER und EGLI, 1974) erwähnte Änderung des pH-Wertes des Laufmediums während des Trennungsvorganges wurde auch in den eigenen Versuchen unter verschiedenen Bedingungen festgestellt. Es ergaben sich daraus unterschiedliche f-Werte von Lauf zu Lauf (RIEVE et al., 1974) oder, wie am Beispiel von Bromphenolblau gezeigt, sogar innerhalb dreier gleichzeitig der Trennung unterworfenen Platten einer Gelcharge. Auch kann das Keimwachstum an den Stellen mit geändertem pH-Wert völlig ausbleiben. Weiterhin wurden Unterschiede der Wanderungstrecken innerhalb derselben Platte zwischen Untersuchungsproben, Standard-Einzelproben und -Mischproben von mehreren mm festgestellt. Bei gleicher Matrix (Rohmilch oder Magermilch) wird deren Ursache in der unterschiedlichen Dissoziation der Antibiotika auf Grund verschiedener pH-Werte und anderen Elektrolytgehaltes der einzelnen Proben gesehen. Die unterschiedlichen Pufferbedingungen können sich durch das Einstellen des pH-Wertes aller Proben auf einen einheitlichen Wert, durch das Zusammenmischen verschieden gepufferter Standard-Einzelproben zu einer Standard-Mischprobe oder durch normale physiologische Unterschiede bei Rohmilchproben ergeben.

Die Feststellung, daß ein unterschiedlicher Elektrolytgehalt wie bei eingedickter und normaler Milch bzw. bei Harn und Milch auch verschiedene f-Werte zur Folge hat, wurde bereits von LIGHTBOWN und de ROSSI (1965) und SCHMIDHOFER und EGLI (1974) getroffen. Betrachtet man die Abbildungen einiger Autoren (LIGHTBOWN und de ROSSI, 1965; ROTH, 1971) daraufhin, so scheint diese Beobachtung bei dem Vergleich von Standard-Einzelproben zu Standard-Mischproben unter der Voraussetzung etwa gleicher Konzentrationen bestätigt zu werden. Das Einstellen des pH-Wertes aller Proben auf einen gemeinsamen Wert ist daher nicht unbedingt empfehlenswert. Der daraus resultierende Elektrolytgehalt kann sich sowohl auf die Wanderungsgeschwindigkeit als auch auf die Testkeimempfindlichkeit (LANGNER et al., 1973c; RIEVE et al., 1974; SCHMIDHOFER und EGLI, 1974) auswirken. Unter diesen Voraussetzungen erscheint die Annahme antibiotikaspezifischer, konstanter Wanderungstrecken und ihre Angabe in mm, wie auch bereits von RIEVE et al. (1974) erwähnt, als fragwürdig. Untersuchungen zur Differenzierung von Antibiotika mit der Elektrophoresetechnik sollten grundsätzlich mit dem Einsatz von Standard-Einzel- oder -Mischproben als Vergleichsproben mit gleicher Matrix wie bei der zu untersuchenden Probe erfolgen (RIEVE et al., 1974; SCHMIDHOFER und EGLI, 1974), um zumindest Unterschiede der f-Werte durch die Präparation des Laufmediums von Platte zu Platte zu vermeiden.

Die von ROTH (1971) vorgeschlagene Methode zur Bestimmung der Laufstrecken anhand der f-Scheitelpunkte geht von der Voraussetzung aus, daß das Verhältnis der Wanderung der von ihm untersuchten Antibiotika zu der des Penicillins konstant ist. Leider war diese Konstanz für die von ROTH be-

schriebenen und für andere Pufferbedingungen bei dem hier verwendeten Gerät nicht gegeben. Weiterhin variierten die Flächenausmaße der Hemmzonen von Trennung zu Trennung bei gleichen Konzentrationen. Dadurch wird die von ROTH gleichzeitig durchgeführte quantitative Antibiotikabestimmung stark eingeschränkt, es sei denn, es würde eine Standard-Verdünnungsreihe des vermuteten Antibiotikums zum Vergleich eingesetzt. Damit könnte jedoch pro Platte nur eine einzige Fremdprobe untersucht werden. Die gleichzeitige quantitative Erfassung des gesuchten Antibiotikums in der von ROTH (1971) beschriebenen Art läßt sich nicht realisieren. Die besprochenen Gel-Elektrophoresetechniken gestatten bestenfalls eine qualitative und semiquantitative Aussage (GRYNNE, 1973). Bereits für qualitative Untersuchungen unterliegt eine Standardisierung der Hochspannungs-Gel-Elektrophorese auf Grund der erwähnten schwer kontrollierbaren Pufferbedingungen (LANGNER et al., 1973a) und der Konzentrationsabhängigkeit der Meßpunkte großen Schwierigkeiten. Exakte Quantitätsbestimmungen sollten dem für das bereits qualitativ bestimmte Antibiotikum geeignetsten Nachweis überlassen bleiben.

Der rein technische und zeitliche Aufwand bei der Hochspannungs-Gel-Elektrophorese wird höher eingeschätzt als RIEVE et al. (1974) das tun. Die Auffassung von HAMANN et al. (1976) und GANSWINDT (1978), eine derartige Differenzierung nur speziell dafür eingerichteten und eingearbeiteten Labors zu überlassen, wird geteilt. Allein die Herstellung mehrerer, jeweils frischer Kontrollsubstanzen als Mischproben, erfordert viel Zeit.

Bei der Frage nach der Differenzierung von Antibiotika in der Milch kann man sich nicht nur auf die in der Euterthe-

rapie angewandten Antibiotika beschränken. Grundsätzlich ist mit jedem weiteren, parenteral beim Rind applizierten Antibiotikum, das einen Blutserumspiegel erreicht und die Blut-Milchschranke überwinden kann, in der Milch zu rechnen. Bei der Vielzahl der heute dafür zur Verfügung stehenden Antibiotika erfordert dies entweder eine ebenso große Zahl spezifischer Nachweismethoden oder universeller Differenzierungstechniken wie der Gas- oder Dünnschichtchromatographie oder der Elektrophorese. Letztere Verfahren müssen jedoch ein deutliches Trennergebnis garantieren können. Die relativ grossen Hemmzonen, mikrobiologisch mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie oder der Hochspannungs-Gel-Elektrophorese nachgewiesener Antibiotika, erfordern zu ihrer deutlichen Trennung genügend weit auseinanderliegende f-Strecken. Diese Forderung könnte von der Hochspannungs-Elektrophorese mit bis zu 40 cm und sogar mehr großen Trennplatten erfüllt werden. Um jedoch zu entsprechend weiten f-Werten innerhalb einer angemessenen Trenndauer von ca. 2 Stunden zu gelangen, müssen hohe elektrische Feldstärken angewandt werden. Die dabei auftretenden Schwierigkeiten (Gelartefakte, pH-Wert- und Elektrolytschwankungen beeinflussen den mikrobiologischen Nachweis und machen eine Konstanz der f-Werte unmöglich) schränken die Verwendung der Elektrophorese als universelle Differenzierungsmöglichkeit jedoch stark ein.

Auf die in der Elektrophoresetechnik übliche Anwendung der relativen Wanderungsstrecke (R_{St} -Wert = Verhältnis der Wanderung einer Substanz in mm zur Wanderung einer Bezugssubstanz in mm) wurde bewußt verzichtet, um die durch die Inhomogenität des Laufmediums und durch die Konzentrationsabhängigkeit verursachte Änderung der Meßstrecken zu verdeutlichen. Sinnvollerweise sollte jedoch nur mit dem R_{St} -Wert gearbeitet werden.

Es wird deshalb vorgeschlagen, eine schrittweise Differenzierung von Antibiotika in der Milch über technisch leichter durchzuführende Methoden vorzunehmen und bei Zweifelsfällen eine auf einen bestimmten pH-Wert und ein bestimmtes mikrobiologisches Testsystem abgestimmte elektrophoretische Differenzierung durchzuführen.

5. Zusammenfassung

1. Ziel der Untersuchung war die Prüfung der Frage, ob Antibiotika in der Kuhmilch mit Hilfe der Hochspannungs-Gel-Elektrophorese identifiziert werden können. Die Untersuchung erstreckte sich auf die Antibiotika Penicillin G, Chloramphenicol, Erythromycin, Neomycin, Rifamycin-SV, Dihydrostreptomycin, Tetracyclin, Oxytetracyclin und Chlortetracyclin. Für die elektrophoretische Trennung stand die Hochspannungs-Elektrophorese-Apparatur der Firma HÖLZEL (Dorfen), 0 - 10 000 V stufenlos regulierbar, mit eingebauter Kontaktkühlung und einer Trennkammergröße von 50 x 40 cm, zur Verfügung. Die Differenzierung der Antibiotika erfolgte als hochspannungselektrophoretische Trennung mit mikrobieller Detektion.
2. Ausgangspunkt der Untersuchungen waren die einschlägigen Methoden von SCHMIDHOFFER und EGLI (1973, 1974) und ROTH (1971). Die Verfahren mußten erheblich modifiziert werden. Geprüft wurden hierbei die Einflüsse von Art, Pufferung, pH-Wert und Schichtdicke der Laufmedien, von Spannung, Kühltemperatur und dem Verhältnis von Gelpufferung zu Elektrodenpuffer sowie von Schichtdicke und pH-Wert der Nachweismedien auf das Elektropherogramm. Zur besseren Identifizierung unbekannter Hemmzonen wurde der Begriff "Konzentrationsschwerpunkt" vorgeschlagen. Auf die Abhängigkeit der Wanderungsstrecken der Scheitel- und "Konzentrationsschwerpunkte" gewanderter Hemmzonen von der Konzentration des Antibiotikums wurde hingewiesen. Auch unter diesen modifizierten Bedingungen war es nicht möglich,

eine zuverlässige Trennung der geprüften Antibiotika zu erzielen.

3. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen erwies sich folgende Methodik als günstigste: 2,5 % Agar Noble (DIFCO) mit 10 Vol. % 1/150 molarem Phosphatpuffer pH 8,0 als Laufmedium in einer Schichtdicke von 1,5 mm; Blättchentest mit Entfernung der Träger nach einer Vordiffusion von einer Stunde bei Zimmertemperatur; Trennung bei 2500 V und einer Kühltemperatur von 10° C; Überschichtung mit Antibiotic Medium 1 (DIFCO) pH 6,6 für die Testkeime *Sarc. lutea* und *B. cereus* sowie Testagar (MERCK) pH 8,0 für den Testkeim *B. subtilis*.
4. Eine Identifizierung von Antibiotika in der Milch auf Grund der alleinigen elektrophoretischen Trennung mit mikrobieller Detektion wird für nicht praktikabel gehalten. Der Wert der elektrophoretischen Trennung besteht bestenfalls in der Weiterdifferenzierung bestimmter, durch andere Methoden nicht eindeutig identifizierbarer Substanzen.

6. Summary

1. Object of the investigations was the identification of antibiotics in cow milk by High-Voltage-Gel-Electrophoresis. The following antibiotics have been investigated: Penicillin G, Chloramphenicol, Erythromycin, Neomycin, Rifamycin-SV, Dihydrostreptomycin, Tetracyclin, Oxytetracyclin and Chlortetracyclin. The electrophoretic differentiation was achieved by the "Hochspannungs-Elektrophorese-Apparatur HÖLZEL (Dorfen)", variable from 0 to 10 000 V with integrated contact cooling and a 50 to 40 cm separation chamber. The differentiation of antibiotics has been achieved by high-voltage electrophoresis and microbiological detection.
2. The investigations started with the methods of SCHMIDHOFER and EGLI (1973, 1974) and ROTH (1971). The methods had to be modified. There was examined the influence of type, buffering, pH and thickness of the separating gels, of voltage, cooling temperature and the relation between gel buffering and electrode buffer as well as of thickness and pH of the microbiological detection for the electropherogram. For better identification of unknown zones of inhibition the term "centre of concentration" was proposed. It has been referred to the dependence of migration of the vertex and "centre of concentration" of migrated zones of inhibition from the concentration of the antibiotics. Even under these modified conditions no reliable separation of the tested antibiotics has been obtained.

3. Following method proved to be the best: 2,5 % Agar Noble (DIFCO), 10 Vol. % 1/150 molar phosphate buffer pH 8,0 as separation medium in a thickness of 1,5 mm; disc-test with removing of the discs after pre-diffusion for one hour at room temperature; separation at 2 500 V with cooling temperature of 10⁰ C; covering second agar layer by Antibiotic Medium 1 (DIFCO) pH 6,6 for the test organisms *Sarc. lutea* and *B. cereus* and Testagar (MERCK) pH 8,0 for the test organism *B. subtilis*.
4. Identification of antibiotics in milk by electrophoretic separation only and microbiological detection seems to be practicable. The meaning of electrophoretic separation serves only for additional differentiation of substances, which cannot be identified definitely by other methods.

Tabelle 1

Vergleich technischer Einzelheiten zwischen der Methodik nach SCHMIDHOFER und EGLI (1974) und dem eigenen Grundversuch

Metho- dik	%ige Agarose	Phosphatpufferung Vol. %	pH	Schicht- dicke mm	Spannung (V)	Strom (mA)	Feldst. (E) (V/cm)	Zeit (Min.)	Vorl. (V/Min.)	
A	1	10	1/15	5,5	1,3	1000	15-25	25	120	100/5
B	1	10	1/15	5,5	1,3	1000	8	19	60	100/5

A= Versuchsanordnung nach SCHMIDHOFER und EGLI (1974) mit dem Gerät der Firma CAMAG

B = Eigene Versuchsanordnung mit dem Gerät der Firma HÖLZEL

Tabelle 2

Verteilungsmuster einiger Antibiotika bei saurer Auftrennung (pH 5,5) mit dem Laufmedium Agarose auf Platten mit Bahneinteilung

	P	O	N	CTC	OTC	C
Konzentration	1 I.E.	10 µg	20 µg	1 µg	10 µg	10 µg
f-SP*	+120	+101	+35	-46	-58	-54
f-MP**	+ 75	+ 87	+13	-36	-38	-45
Ø***	87	27	41	20	39	18
Testkeim	B.s.	B.s.	B.s.	S.l.	S.l.	S.l.

P = Penicillin G, O = Oxacillin, R = Rifamycin-SV, CTC = Chlortetracyclin, OTC = Oxytetracyclin, E = Erythromycin, N = Neomycin, C = Chloramphenicol, DS = Dihydrostreptomycin
B.s. = *B. subtilis*, B.c. = *B. cereus*, S.l. = *Sarc. lutea*

*) f-Scheitelpunkt in mm

**) f-Hemmzonen-Mittelpunkt (Längsdurchmesser) in mm

***) Hemmzonen-Längsdurchmesser in mm

Tabelle 3

Verteilungsmuster einiger Antibiotika bei saurer Auftrennung (pH 5,5)
mit dem Laufmedium Agarose auf Platten mit Bahneinteilung

	P	O	R	CTC	OTC
Konzentration	1 I.E.	10 µg	10 µg	1 µg	10 µg
f-SP*	+106	+89	-57	-77	-71
f-MP**	+ 88	+72	-37	-48	-54
Ø***	36	34	40	59	73
Testkeim	B.s.	B.s.	B.C.	B.C.	B.C.

Zeichenerklärung s. Tab. 2

Tabelle 4

Einfluß der Spannung auf die "f-Konzentrationssschwerpunkte"
verschiedener Antibiotika (Agar Noble, pH 5,5)

Spannung (V)	P mm	R mm	N mm	DS mm	OTC mm	C mm	E mm	Br.bl.* mm
2000	+10		+ 3		- 80	- 80		
2500	+15	- 38	+20	+13	-104	-128	-188	+ 83
3000	+64	-122	+ 5	+18	-120	-163	-263	+130

*) Bromphenolblau

Zeichenerklärung s. Tab. 2

Tabelle 5

Einfluß der Kühltemperatur auf die "f-Konzentrationsschwerpunkte" verschiedener Antibiotika (Laufmedium Agar Noble, pH 5,5)

Kühl- temper. (° C)	P mm	N mm	DS mm	R mm	CTC mm	C mm	E mm	Br.bl. mm
3	+32	+5	-14	-63	- 84	-114	-187	+ 97
10	+59	+5	-22	-68	-114	-163	-262	+115
% Steigerung pro 7° C Temperatur- erhöhung	84,3	0	57,1	7,9	35,7	42,9	40,1	18,5
% Steigerung pro 1° C Temperatur- erhöhung	12,04	8	8,2	1,1	5,1	6,1	5,7	2,6

Zeichenerklärung s. Tab. 2

Tabelle 6

Einfluß der Viskosität des Laufmediums auf die "f-Konzentrationschwerpunkte" verschiedener Antibiotika (Laufmedium Agarose, pH 7,5) und auf Gelartefakte

%ige Agarose	Br.bl. mm	P mm	R mm	OTC mm	C mm	Artefakte		
						Schlieren	"Wanne" kat.	Gelriß
1	+184	+87		-77	-80	+++	+++	+
2	+177		-29	-60	-76	+	+	+
3	+216	+87	-14	-63	-77	-	**	-

Zeichenerklärung s. Tab. 2

*) pos.

**) neg.

Tabelle 7

Einfluß der Elektrolytkonzentration des Trenngels auf die "f-Konzentrationssschwerpunkte" verschiedener Antibiotika und auf Gelartefakte (Laufmedium: 2,5 %ige Agarose, pH 7,5)

Pufferzusatz in Vol. %	Br.bl. mm	P mm	R mm	N mm	OTC mm	C mm	E mm	Artefakte	
								Schlieren	"Wanne" kat.
10	+181	+89	+31	+5	-17	-28	-136	+++	+
50	+146		+39	+8	-7	-32	-102	++	+
100	+154	+76	+21	+4	0	-28	-82	+	- **

Zeichenerklärung s. Tab. 2

Zur Pufferung des Laufmediums wurde 1/30 molarer Phosphatpuffer verwendet

*) pos.

**) neg.

Tabelle 8

Inkonstanz der "f-Konzentrationssschwerpunkte" von Bromphenolblau unter physikalisch-chemisch gleichen Bedingungen (Laufmedium Agar Noble, 2,5 %ig)

10 Vol.-% 1/150 mol. Phosphatpuffer pH	Platten *	Br.bl. mm
8,0	A	+109
	B	+ 89
	C	+ 98
8,0	A	+103
	B	+ 94
	C	+ 96
5,0	A	+ 70
	B	+ 55
	C	+ 66
5,0	A	+ 81
	B	+ 79
	C	+ 78

*) ABC = drei jeweils gleichzeitig getrennte Platten einer Präparations-Charge

Tabelle 9

Verhalten von Standard-Mischproben zu -Einzelproben

	OTC	OTC-Mp*	R	R-MP*	N	N-MP*
Konz. ($\mu\text{g/ml}$)	6	6,85	0,143	0,125	3,125	3,57
f-SP (mm) **	-91	-88	-49	-46	+29	+29
f-KP (mm) ***	-83	-80	-42	-39	+26	+25
$\emptyset$ (mm)	17	16	15	16	3	8

Zeichenerklärung s. Tab. 2

*) Mischprobe

**) f-Scheitelpunkt

***) "f-Konzentrationssschwerpunkt"

Tabelle 10

Standard-f-Werte verschiedener Antibiotika (2,5 % Agar Noble mit 10 Vol. % 1/150 molarem Phosphatpuffer, pH 5,5)

Antibiotikum ($\mu\text{g/ml}$)	f-SP*	min./max. Diff.	f-KP*	min./max. Diff.	ϕ^{***}
50	+ 42		+ 32		41
25	+ 39		+ 32		25
12,5 N	+ 35	9	+ 31	2	13
6,25	+ 33		+ 30		7
1	-108		- 64		75
0,5	- 95		- 63		55
0,25 R	- 81	43	- 61	4	38
0,125	- 65		- 60		10
24	-186		-168		76
12	-180		-161		59
6 OTC	-173	24	-157	14	38
3	-162		-154		15
4	-262		-244		56
2 E	-258	10	-238	13	52
1	-252		-231		47

*) f-Scheitelpunkt in mm

**) "f-Konzentrationsschwerpunkt" in mm

***) Hemmzonenlängsdurchmesser in mm

Zeichenerklärung s. Tab. 2

Tabelle 11

Standard-f-Werte verschiedener Antibiotika (2,5 % Agar Noble mit 10 Vol. % 1/150 molarem Phosphatpuffer, pH 8,0)

Antibiotikum (µg/ml)	f-SP*	min./max. Diff.	f-KP*	min./max. Diff.	Ø***
50	+ 41		+ 23		42
25	+ 37		+ 23		38
12,5 N	+ 34	16	+ 23	0	23
6,25	+ 32		+ 23		20
3,125	+ 25		+ 23		10
1	- 89		- 47		63
0,5	- 73		- 47		42
0,25 R	- 67	30	- 46	1	35
0,125	- 59		- 47		24
24	-128		-107		82
12 OTC	-125	9	-109	2	50
6	-125		-109		25
4	-237		-213		54
2 E	-237	4	-214	3	50
1	-235		-216		44
0,5	-233		-216		31

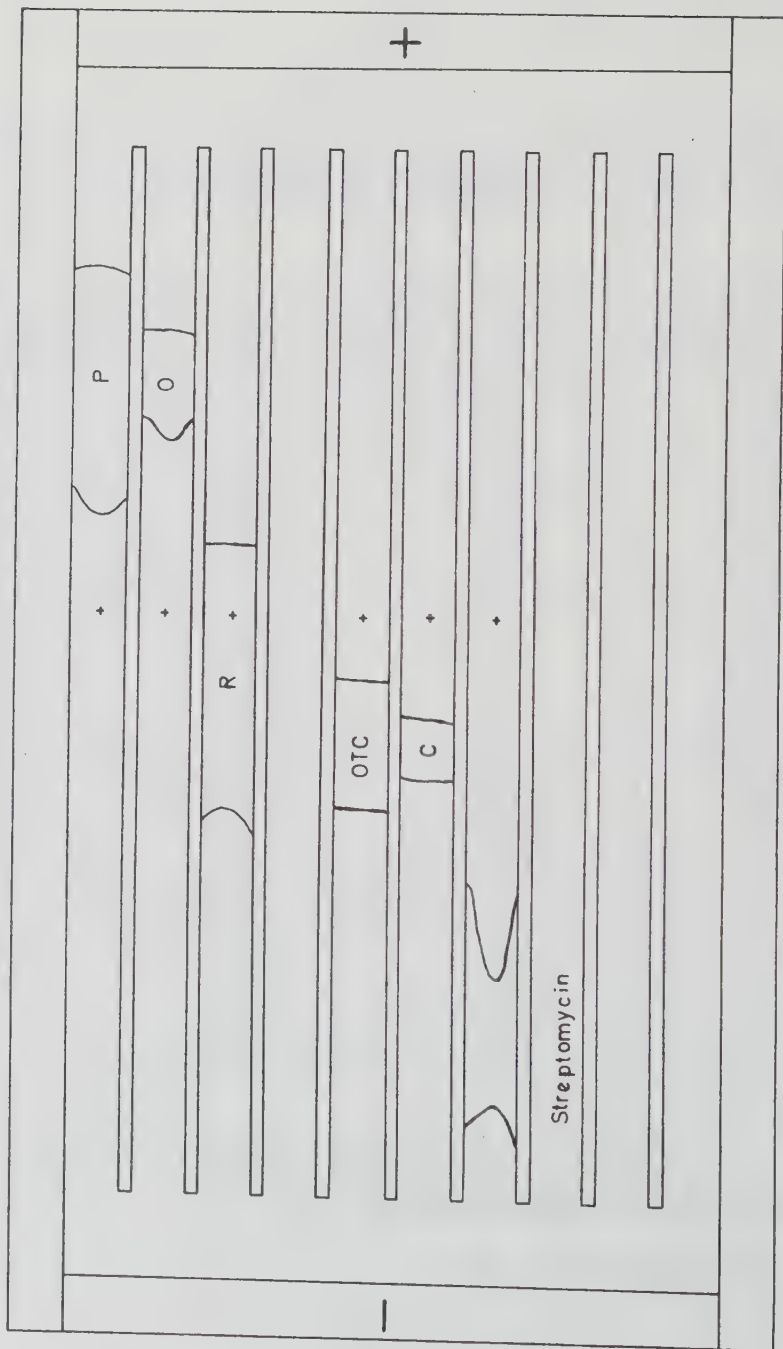
*) f-Scheitelpunkt in mm

**) "f-Konzentrationsschwerpunkt" in mm

***) Hemmzonenlängsdurchmesser in mm

Zeichenerklärung s. Tab. 2

Abb. 1 : Hemmzonenformen verschiedener Antibiotika bei Platten mit Bahneinteilung



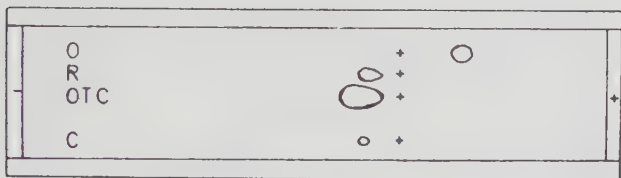


Abb. 2: Agarose pH 4,5

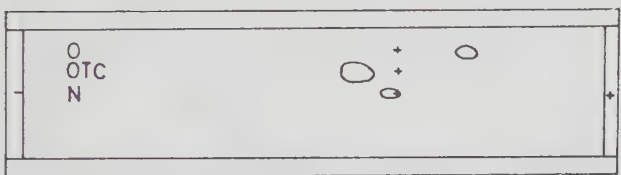


Abb. 3: Agarose pH 5,5

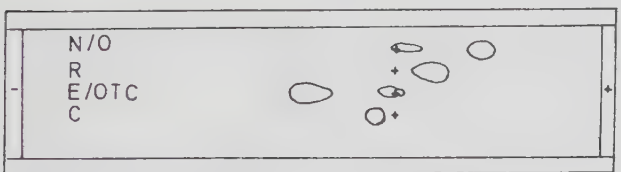


Abb. 4: Agarose pH 7,0

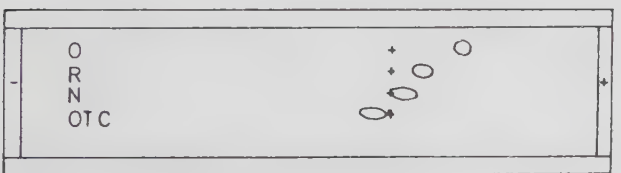


Abb. 5: Agarose pH 7,5

Abb. 2-5: Verteilungsmuster einiger Antibiotika
im sauren und alkalischen pH-Bereich
(Laufmedium Agarose)

Zeichenerklärung s. Tab. 2

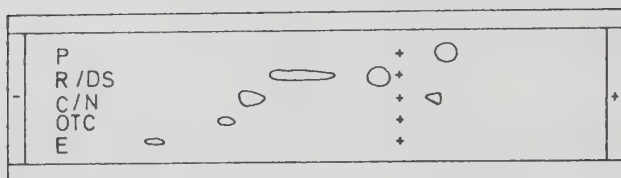


Abb. 6: Agar Noble pH 5,5

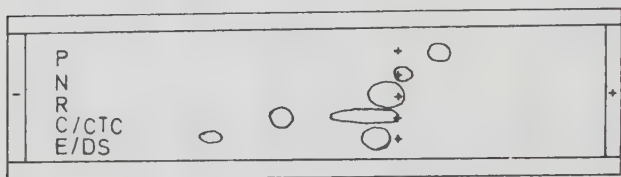


Abb. 7: Agar Noble pH 7,5

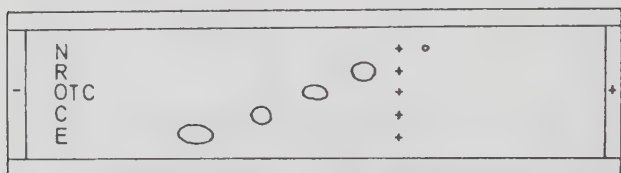


Abb. 8: Agar Noble pH 8,0

Abb. 6-8: Verteilungsmuster einiger Antibiotika
im sauren und alkalischen pH-Bereich
(Laufmedium Agar Noble)

Zeichenerklärung s. Tab. 2

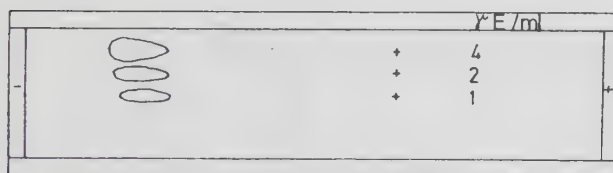
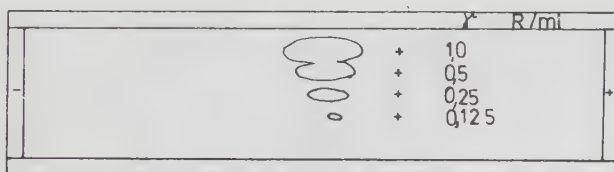
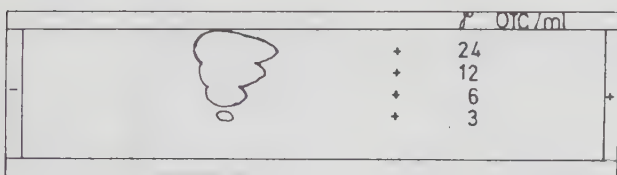


Abb. 9: Konzentrationsstandardreihen verschiedener Antibiotika auf 2,5 % Agar Noble mit 10 Vol.% 1/150 molarem Phosphatpuffer pH 5,5
Zeichenerklärung s. Tab. 2

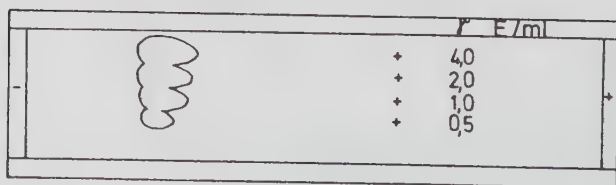
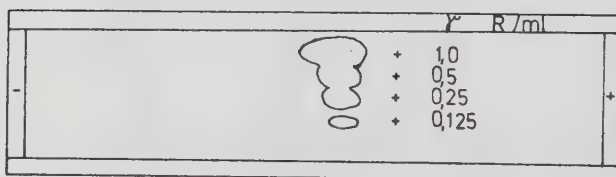
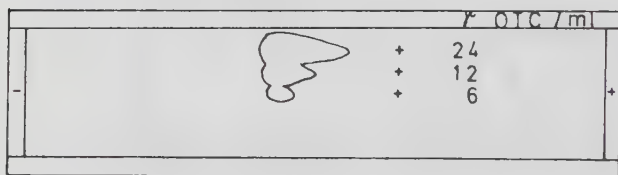
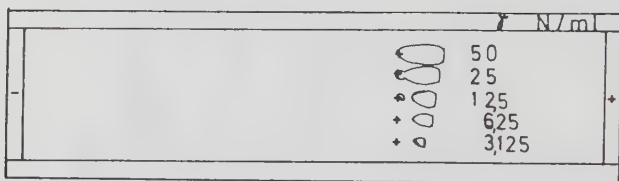


Abb. 10: Konzentrationsstandardreihen verschiedener Antibiotika auf 2,5 % Agar Noble mit 10 Vol. % 1/150 molarem Phosphatpuffer pH 8,0

Zeichenerklärung s. Tab. 2

Abb. 11: Konzentrationsabhängigkeit von f-Scheitelpunkt und "f-Konzentrationssschwerpunkt" bei Neomycin und Rifamycin auf Agar Noble pH 5,5 und 8,0

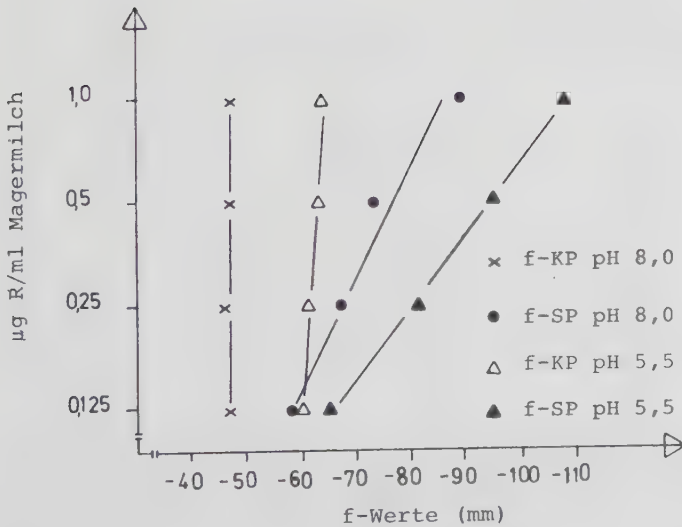
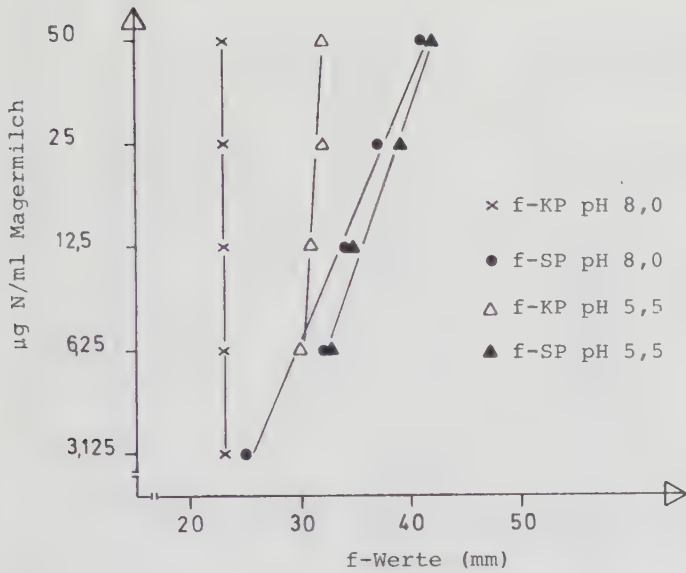


Abb. 12: Konzentrationsabhängigkeit von f-Scheitelpunkt und "f-Konzentrationssschwerpunkt" bei Oxytetracyclin und Erythromycin auf Agar Noble pH 5,5 und 8,0

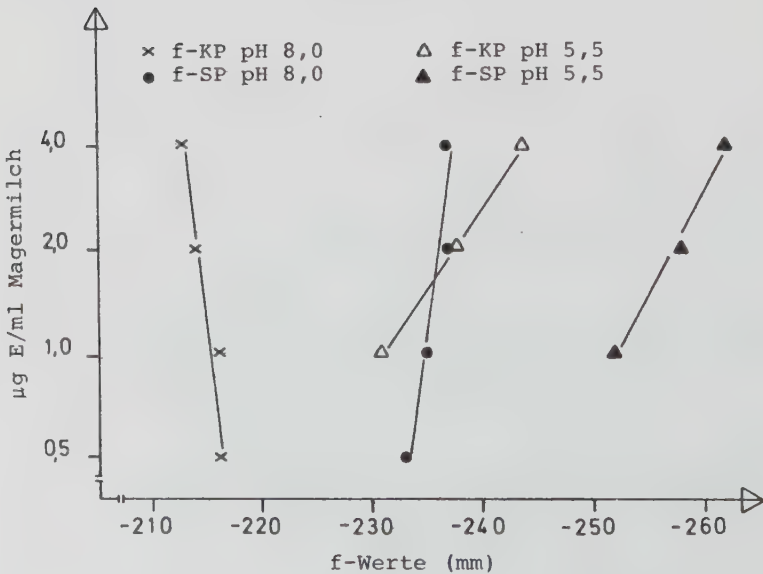
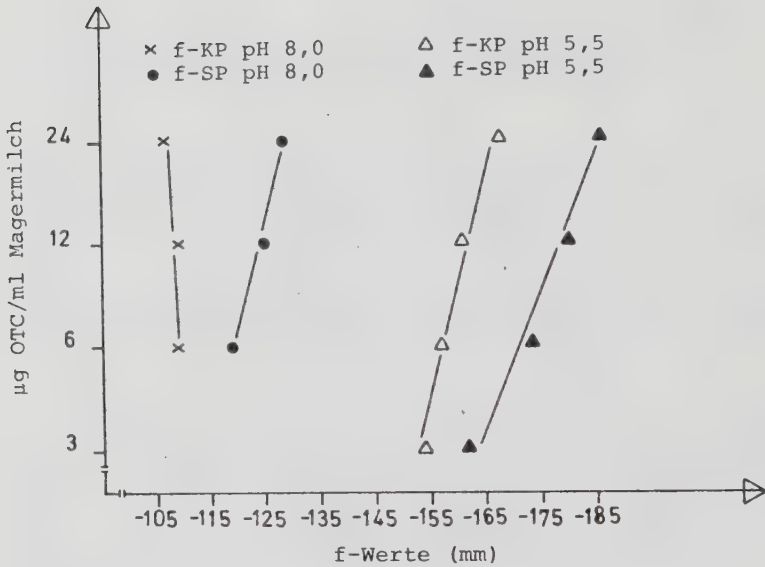
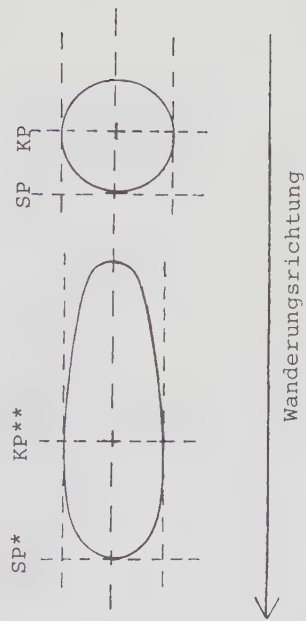


Abb. 13: Scheitelpunkt und "Konzentrationschwerpunkt"
am Beispiel einer ovoiden und einer runden Hemmfläche



* Scheitelpunkt

** "Konzentrationschwerpunkt"

7. Literaturverzeichnis

ALCINO, J.F. (1946)

Jodometric method for the assay of penicillin preparations
Ind. Eng. Chem. Anal. 18, 619-620

ASZALOS, A., S. DAVIS und D. FROST (1968)

Classification of crude antibiotics by instant thinlayer
chromatography (ITLC)

J. Chromatogr. 37, 487-498

ATFIELD, G.N. und C.J.O.R. MORRIS (1961)

Analytical separations by high-voltage paper electrophoresis.
Amino acids in protein hydrolysates
Biochem. J. 81, 606-614

BAROLLIER, J., E. WATZKE und H. GILIAN (1958)

Z. Naturforsch. 13b, 754

Zit. nach K. DOSE, 1961

BOXER, G.H., V.C. JELINEK und P.M. LEGHORN (1947)

Colorimetric determination of streptomycin in clinical
preparations, urine and broth

J. biol. Chem. 169, 153

BUNDESGESETZ, BRD (1974)

Rückstandsuntersuchungen

Bundesgesetzblatt, Teil I, Anlage 4 zu § 20 Abs. 4 AB.A

CAPLIS, M.E., H.S. RAGHEB und E.D. SCHALL (1965)

Determination of tetracyclin antibiotics by alternating-
current polarography

J. Pharm. Sci. 5, 694

CORETTI, K. (1959)

Mikrobiologischer Nachweis von Hemmstoffen in Gelatine
Fleischwirtschaft 11, 737-739

DOBRY, R., R.K. FINN (1958)

Chem. Engng. Progr. 54, 59

Zit. nach K. DOSE, 1961

DOSE, K. (1961)

Elektrophorese (einschließlich Papierelektrophorese)
aus ULLMANN'S Enzyklopädie der technischen Chemie
3. A. Band II/1, 166-180

Urban und Schwarzenberg, München-Berlin

DOSCOCIL, J. (1964)

Quantitative polarographische Bestimmung des Oxytetra-
cyclins (Terramycin) und Chlortetracyclins (Aureomycin)
nebeneinander

Pharmazie 9, 394

DURRUM, E.L. (1950)

J. Amer. Chem. Soc. 72, 2943

Zit. nach K. DOSE, 1961

derselbe (1951)

J. Amer. Chem. Soc. 73, 4875

Zit. nach K. DOSE, 1961

EBNER, R. (1977)

Nachweis und Identifikation von Antibiotika im Harn von
Rindern mit Hilfe des mikrobiologischen Hemmstofftests
und der Dünnschichtchromatographie
Vet. med. Diss., München

EVARD, E., M. CLAESEN und H. VANDERAEGE (1964)

Gas chromatography of penicillin and penicillanic acid esters

Nature 201, 1124-1125

FOSSDAL, K. und E. JACOBSEN (1971)

Polarographic determination of chloramphenicol

Anal. Chim. Acta 56, 105-115

FOOD and DRUG ADMINISTRATION (1978)

KRAMER, J.

Antibiotic residues in milk, dairy products and animal tissues: Methods, reports and protocols

National Center for Antibiotic and Insulin Analysis

Food and Drug Administration, Washington D.C. 20204

GANSWINDT, I. (1978)

Zur Brauchbarkeit von Harn- statt Nierenproben und Zwerchfellsmuskulatur statt Extremitätenmuskulatur bei der Untersuchung von Schweinen auf Hemmstoffe, geprüft mit drei verschiedenen biologischen Nachweisverfahren
Vet. med. Diss., Hannover

GARTSIDE, R.N. (1960)

The detection of antibiotics in canned meat

Zit. nach L.ROTH, 1971

GEDEK, W. und Chr. BAATH (1976)

Erfassung Penicillinase-fester Penicilline in Milch durch Penicillin-Beta-Lactamase

Arch. Lebensmittelhyg. 27, 170-172

GEDEK, W. (1977)

Erfassung von Cephalosporinen in Rohmilch durch
B. cereus-Beta-Lactamase
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 84, 340-342

GLAZKO, A.J., L.M. WOLF und W.A. DILL (1949)

Biochemical studies on chloramphenicol (chloromycetin).
1. Colorimetric methods for the determination of chlor-
amphenicol and related nitro compounds
Arch. Biochem. 23, 411

GRASSMANN, W. und K. HANNIG (1950)

Naturwissensch. 37, 397, 496
Zit. nach K. DOSE, 1961

GRYNNE, B. (1973)

Identification of small amounts of antibiotics by
electrophoresis and bio-autography
Acta path. microbiol. scand. 81 B, 583-588

HAMANN, J., A. TOLLE, A. BLÜTHGEN und W. HEESCHEN (1976)

Ein System zum Nachweis von Antibiotika in Milch
Milchwissenschaft 31, 18-19

HARDY, W. (1905)

Colloidal solution
London

HISHTA, C., D.L. MAYS und M. GAROFALO (1971)

Gas chromatographic determination of penicillins
Anal. Chem. 43, 1530

IKEKAWA, T., F. IWAMI, E. AKITA und H. UMEZAWA (1963)

Application of thinlayer chromatography for separation
and identification of antibiotics
J. Antibiotics, Ser. A, 56-57

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1970)

Detection of Penicillin in milk by a disc assay technique
International Standard FIL-IDF 57

ISHIDA, N. und J. MIYAZAKI (1952)

Studies on the antibiotic substance from Actinomycetes,
XXI. On the identification of many antibiotics by papyro-
graphic method

II. On the so-called "Summarized Papergram" of Actino-
myces antibiotics and of amino acids

J. Antibiotics, Ser. B 5, 481-487

JOHANSSON, B.G. (1972)

Agarose Gel Electrophoresis

Scand. J. clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 124, 7-19

KATAYAMA, T. und H. IKEDA (1969)

Thin-layer chromatography of streptomycin series

V. Two dimensional chromatography of streptomycins

Scientific Papers of Inst. Phys. Chem. Res. 63, 49-53

KELCH, F. und K. CORETTI (1959)

Zum Nachweis von Aureomycin in Fleisch- und Organproben
von Schlachttieren

Fleischwirtschaft 39, 358-359

KONDO, S., M. SEZAKI und M. SHIMURA (1964)

Paper and thin-layer chromatographies of water-soluble
basic antibiotics produced by Streptomyces

J. Antibiotics, Ser. B 17, 1-6

KRAACK, J. und A. TOLLE (1969)

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Brillant-schwarz-Reduktionstest. I. Teil: Verbesserte Methodik
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145-149

LANGNER, H.J. und U. TEUFEL (1972)

Chemical and microbiological detection of antibiotics.
Thin-layer-chromatographic separation of various anti-biotics

Fleischwirtschaft 52, 1610-1614

LANGNER, H.J., U. TEUFEL, M. SIEGERT und
M. FROMMHOLD (1973a)

Chemical and microbiological detection of antibiotics.
Microbiological detection of various antibiotics

Fleischwirtschaft 53, 243-249

LANGNER, H.J., U. TEUFEL, M. SIEGERT, M. FROMMHOLD
und H. SEIDLER (1973c)

Die Bestimmung von Antibiotikagemischen im Ultra-Mikro-Maßstab mit Hilfe einer neuen "Kurzzeit-Niederspannungselektrophorese"

Fleischwirtschaft 53, 557-559

LIGHTBOWN, J.W. und P. de ROSSI (1965)

The identification and assay of mixtures of antibiotics
by electrophoresis in agar gel

Analyst 90, 89-98

MAEDA, K. , A. YAGI, H. NAGANAWA, S. KONDO und H. UMEZAWA
(1969)

Application of High-Voltage Paper Electrophoresis for
separation and identification of Antibiotics

J. Antibiotics 12, 635-638

MARGOSIS, M. (1970)

Analysis of Antibiotics by gas chromatography
J. Chromatogr. 47, 341-347

MARTEN, G. (1964)

Die mikrobiologische Antibiotikabestimmung in Futtermitteln,
II. Mitteilung
Landwirtsch. Forschung 17, 277-281

MEYER, B., W. THIEL und W. WEIS (1969)

Bedeutung und Nachweis von Hemmstoffen im Rahmen der BU
Fleischwirtschaft 49, 203-209

MICHL, H. (1951)

Monatsh. 82, 489
Zit. nach K. DOSE, 1961

MONASTERO, F. (1952)

A colorimetric determination of streptomycin and
dihydrostreptomycin
J. Am. Pharm. Ass. 41, 322

MOORE, W.J. und D.O. HUMMEL (1973)

Physikalische Chemie
Walter de Gruyter, Berlin-New York

OBERZILL, W. (1962)

Die Antibiotika
aus BRUNNER, R. und G. MACHEK
Die großen Antibiotika, Band I
Verlag Hans Carl, Nürnberg

OH-ISHI, S. (1968)

Blood concentration of chloramphenicol in horses after intramuscular or oral administration

Jap. J. Vet. Sc. 30, 25

PHILPOT, J. St. L. (1940)

Trans. Faraday Soc. 36, 38

Zit. nach K. DOSE, 1961

RIEVE, D., H. WERMERSSEN und Th. ZIMMERMANN (1974)

Untersuchung zur Bestimmung von Antibiotika als Ergänzung zum biologischen Hemmstofftest

Arch. Lebensmittelhyg. 25, 264-267

ROTH, L. (1971)

Vergleich der quantitativen und qualitativen Aussagefähigkeit des allgemeinen mikrobiologischen Hemmstofftests mit dem mikrobiologisch-chemischen Antibiotikanachweisverfahren bei normalgeschlachteten Schweinen, Kälbern und Rindern
Vet. med. Diss., Hannover

derselbe (1974)

Die Differenzierung verschiedener Antibiotika, eine Weiterentwicklung des MC-Tests

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft

Vortrag auf der 15. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene

SCHENK, J.R. und M.A. SPIELMANN (1945)

Formation of maltol by the degradation of streptomycin

J. Amer. Chem. Soc. 67, 2276

SCHMIDHOFER, Th. und H.R. EGLI (1973)

Nachweis antibakterieller Hemmstoffe mit der

Hochspannungselektrophorese

Schriftl. Mitteilung

dieselben (1974)

Nachweis antibakterieller Hemmstoffe mit der Hochspannungselektrophorese

Chimia 28, 424-429

SNELL, N., K. IJICHI und J. C. LEWIS (1956)

Paper chromatographic identification of polypeptidic

Gram-positive inhibiting antibiotics

Appl. Microbiol. 4, 13-17

SVENSSON, H. und I. BRATTSTEN (1949)

Arkiv Kemi 1, 401

Zit. nach K. DOSE, 1961

THOMAS, A.H. und R.A. BROADBRIDGE (1970)

The electrophoretic separation of penicillins and penicillois acids

Analyst 95, 459-462

TISELIUS, A. (1937)

Trans. Faraday Soc. 33, 524

Zit. nach K. DOSE, 1961

TSUJI, K. und J.H. ROBERTSON (1969)

Gas-liquid chromatographic detemination of neomycins

B und C

Anal. Chem. 41, 1332

WEBER, R. (1951)

Helv. Chim. Acta 34, 2031

Zit. nach K. DOSE, 1961

WIEME, R.J. (1965)

Agar-Gel-Elektrophoresis

Elsevier Publish Company, Amsterdam

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Gedek für die Überlassung des Themas und seine jederzeit bereitwillig gewährte Hilfe.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die mir erteilte Unterstützung.

Dank auch allen Mitarbeitern des Lehrstuhles für Hygiene und Technologie der Milch sowie des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V.

Lebenslauf

Am 5. 1. 1945 wurde ich als drittes Kind der Eheleute Wilhelm und Ingeborg Baath, geborene Otto, in Neuhammer am Queiss/Schlesien geboren.

Im Anschluß an eine fünfjährige Volksschulzeit in Gößweinstein/Oberfranken und Erlangen/Mittelfranken besuchte ich in Erlangen das Städtische-Marie-Therese-Gymnasium, an dem ich 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Nach Ableistung des Wehrdienstes begann ich 1968 das Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Nach dem Physikum setzte ich das Studium an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München fort. Die Bestallung zum Tierarzt erhielt ich im November 1973.

